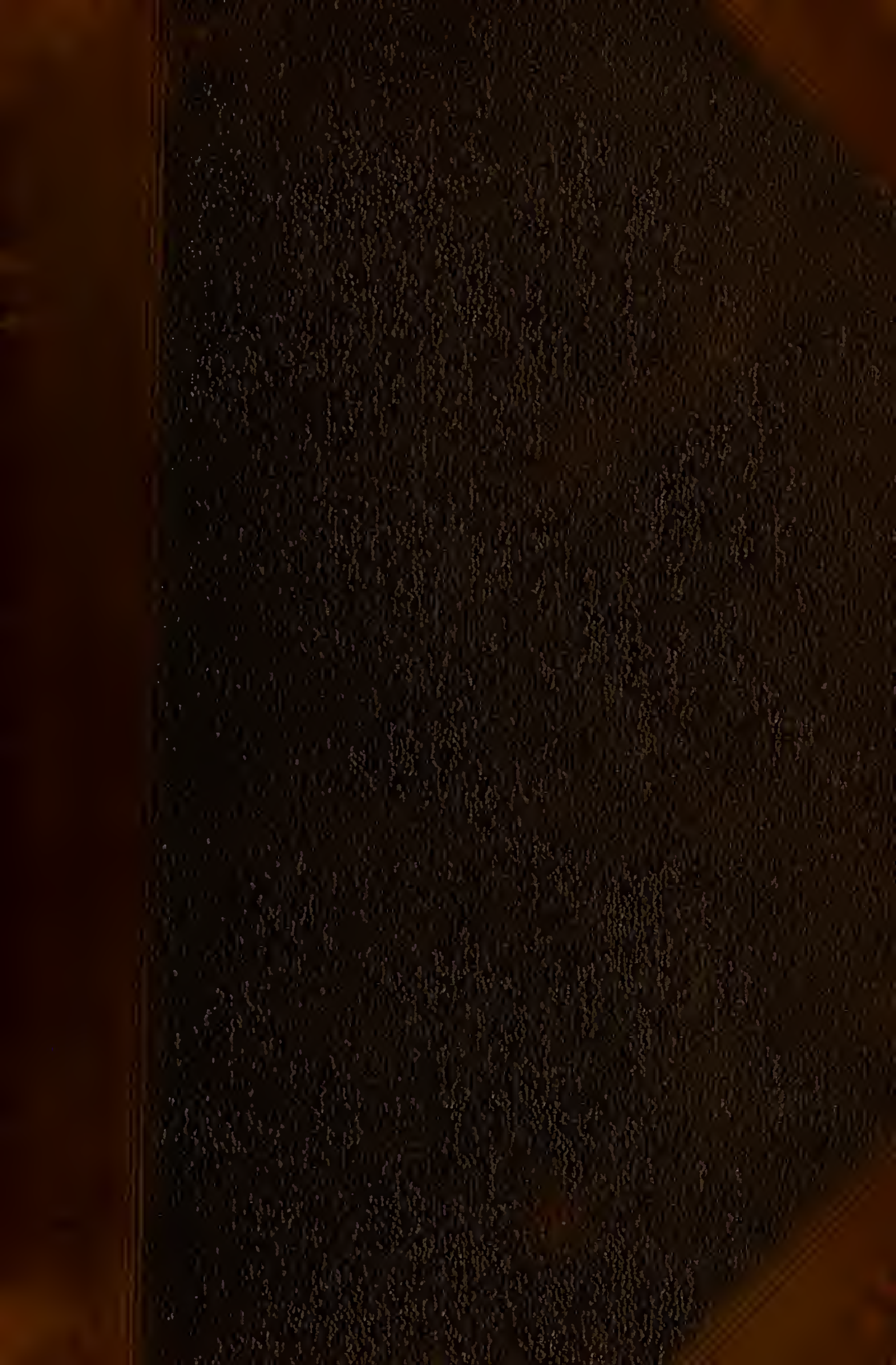



22102048306



UNTERSUCHUNGEN
ÜBER AMINOSÄUREN, POLYPEPTIDE
UND PROTEÏNE

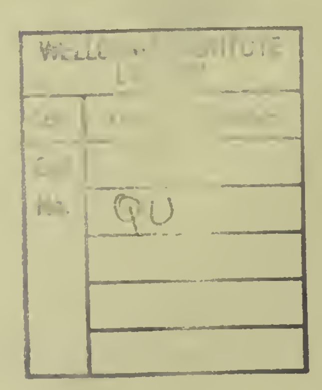
(1899—1906)

VON

EMIL FISCHER



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1906



Vorwort.

Die chemische Bearbeitung der Proteïne hat in den letzten Dezennien einen solchen Umfang angenommen, und die darauf bezüglichen Abhandlungen sind in so vielen Zeitschriften zerstreut, daß jeder auf diesem Gebiete tätige Forscher das Erscheinen besonderer Lehrbücher, z. B. „Der Chemie der Eiweißkörper von Cohnheim", gewiß mit Freude begrüßt hat.

Trotz der dadurch außerordentlich erleichterten Übersicht ist das Studium der Originalabhandlungen noch immer mit Unbequemlichkeiten verbunden. Ich habe mich deshalb entschlossen, meine eigenen hierher gehörigen Untersuchungen, die in vier verschiedenen Zeitschriften erschienen sind, in diesem Buche zusammenzustellen. Es enthält alle auf Aminosäuren, Polypeptide und Proteïne bezüglichen Aufsätze, die von mir allein oder gemeinsam mit jüngeren Fachgenossen von 1899 bis Ende März 1906 veröffentlicht wurden. Außerdem habe ich einige damit im engsten Zusammenhang stehende Arbeiten der Herren Slimmer, Mouneyrat, Leuchs und Suzuki, die unter meiner Leitung entstanden sind, aufgenommen.

Ferner schien es mir zweckmäßig, die Resultate, welche mein langjähriger Mitarbeiter Herr Dr. E. Abderhalden teils allein teils im Verein mit verschiedenen älteren Medizinern im hiesigen Institute bei der Hydrolyse von zahlreichen Proteïnen nach den von mir aufgefundenen Methoden erhielt, am Schluß des Buches im Auszug mitzuteilen.

Alle übrigen Abhandlungen sind wortgetreu wiedergegeben, so daß sie als direkte Literaturquelle angeführt werden können. Kleine Änderungen betreffen nur einige Druckfehler in dem Original oder ganz vereinzelte Zahlenangaben, die bei den späteren Versuchen als ungenau erkannt wurden, z. B. diejenige über das Drehungsvermögen des salz-

sauren *d*-Alanins. Den zahlreichen Hinweisen auf die Originalabhandlungen sind in eingeklammerter Kursivschrift die Seitenzahlen des Buches beigefügt, wodurch seine Benutzung erleichtert wird.

Um Mißverständnissen vorzubeugen, halte ich eine besondere Bemerkung über die Bezeichnung der stereoisomeren Aminosäuren und Polypeptide für notwendig.

Obschon die in den Proteïnen vorkommenden Aminosäuren sehr wahrscheinlich untereinander einen ähnlichen geometrischen Bau besitzen und auch wohl in naher genetischer Beziehung zu den Kohlenhydraten stehen, so ist doch bisher Näheres über ihre Konfiguration nicht bekannt und man kann sie deshalb nicht in sterische Reihen einteilen, wie ich es bei den Zuckern getan habe. Vorläufig bleibt also nichts anderes übrig, als sie empirisch als *d*- und *l*-Verbindung zu unterscheiden und zwar konventionell nach der Drehungsrichtung der wässrigen Lösung oder bei der Asparaginsäure nach der Beziehung zum linksdrehenden Asparagin, wie es schon in vielen Lehrbüchern geschehen ist. Dann ergeben sich für die in den Proteïnen vorkommenden Aminosäuren, deren optische Antipoden künstlich schon dargestellt worden sind, folgende Zeichen:

d-Alanin,
l-Leucin,
l-Phenylalanin,
l-Tyrosin,
l-Asparagin,
l-Asparaginsäure,
d-Glutaminsäure.

Dieselben Buchstaben bleiben für ihre sämtlichen Derivate, auch wenn deren Drehung umgekehrt ist.

Für die racemischen Formen habe ich weder das von mir in der Zuckergruppe gebrauchte „*i*" (inaktiv) noch das von Ladenburg vorgeschlagene „*r*" (racemisch), die beide zu Mißverständnissen führen können, sondern das von mir später gewählte „*dl*" durchgängig benutzt. In derselben Art ist die Konfiguration der Polypeptide durch die Zeichen „*d*", „*l*" und „*dl*" ausgedrückt.

Den etwas schwerfälligen Namen „Proteïnstoffe" oder „Proteïnkörper" habe ich in den späteren Abhandlungen in Proteïne abgekürzt. Das in der englischen Literatur im gleichen Sinne gebrauchte Wort

„Proteïd“ konnte ich leider nicht annehmen, weil man darunter in Deutschland seit langen Jahren nach einem Vorschlag von Hoppe-Seyler eine beschränkte Klasse von komplizierten Proteïnen versteht.

Die Anordnung des Stoffes in dem Buche ist soweit wie möglich systematisch und im übrigen chronologisch.

Als Einleitung wurde der Vortrag benutzt, den ich im Januar 1906 vor der deutschen chemischen Gesellschaft gehalten habe und in dem sämtliche Resultate in übersichtlicher Weise zusammengefaßt sind.

Der experimentelle Teil enthält alle Einzelabhandlungen ungefähr in der gleichen Reihenfolge, wie sie in der Einleitung besprochen sind.

Das am Schluß befindliche alphabetische Sachregister ist von Herrn Dr. E. Abderhalden hergestellt. Ich sage ihm dafür ebenso wie für das Mitlesen der Korrektur auch hier besten Dank.

Berlin, im April 1906.

Emil Fischer.



Inhalt.

Seite

I. Einleitung.



Einleitung.[1]

Da die Proteïnstoffe bei allen chemischen Prozessen im lebenden Organismus auf die eine oder andere Weise beteiligt sind, so darf man von der Aufklärung ihrer Struktur und ihrer Metamorphosen die wichtigsten Aufschlüsse für die biologische Chemie erwarten. Es ist deshalb kein Wunder, daß das Studium jener Stoffe, von dem die Chemiker sich seit länger als einem Menschenalter fast ganz zurückgezogen haben, weil sie lohnendere Arbeit in der Ausbildung der synthetischen Methoden oder dem Studium einfacherer natürlicher Verbindungen fanden, von den Physiologen in immer steigendem Maße und mit unverkennbarem Erfolge gepflegt wurde. Trotzdem werden die Eingeweihten niemals daran gezweifelt haben, daß die organische Chemie, deren Wiege bei den Proteïnen gestanden hat, sich ihnen schließlich wieder zuwenden werde. Nur über den Zeitpunkt, wo ein Zusammenwirken von Biologie und Chemie erfolgreich sein werde, gingen und gehen noch heute die Ansichten auseinander.

Während vorsichtige Fachgenossen befürchten, daß eine rationelle Bearbeitung dieser Körperklasse durch ihre verwickelte Zusammensetzung und ihre höchst unbequemen physikalischen Eigenschaften heute noch auf unüberwindliche Schwierigkeiten stoßen werde, neigen andere, optimistisch veranlagte Beobachter, zu denen ich mich zählen will, zu der Ansicht, daß man wenigstens den Versuch machen soll, mit allen Hilfsmitteln der Gegenwart die jungfräuliche Feste zu belagern; denn nur durch das Wagnis selbst kann die Grenze für die Leistungsfähigkeit unserer Methoden ermittelt werden. Der nüchternen Kritik wird man allerdings nicht das Recht verwehren können, die Aussicht auf den Erfolg zu diskutieren, indem sie die jeweiligen Kenntnisse vergleicht mit dem, was zur Erreichung des Zieles notwendig ist.

---

[1]) Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteïne. Vortrag, gehalten in der Deutschen chemischen Gesellschaft am 6. Januar 1906. Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft **39**. 530 [1906].

Zu meinem lebhaften Bedauern ist der Inhalt meines Vortrages von der Tagespresse vielfach mit phantastischen Übertreibungen besprochen worden. Man wird aus dieser kritisch gehaltenen Abhandlung, über deren Rahmen ich beim Vortrag nicht hinausgegangen bin, die Überzeugung gewinnen, daß ich mich keiner Überschätzung der Resultate schuldig gemacht habe.

In bezug auf Unterscheidung, Isolierung und biologische Charakterisierung der zahlreichen natürlichen Proteïne hat die physiologische Chemie Bemerkenswertes geleistet. Wir kennen mehrere Dutzend scharf unterschiedene Glieder dieser Klasse, die sich nach Löslichkeit und Fällungsverhältnissen in Gruppen ordnen lassen und von denen manche im kristallisierten Zustand gewonnen werden konnten. Wir wissen ferner, daß die einzelnen Individuen Träger verschiedener biologischer Funktionen sind. Wir wissen endlich, daß alle diese Körper unter dem Einfluß bestimmter Fermente tiefgreifende, charakteristische Zersetzungen erfahren.

Trotz alledem sind unsere Kenntnisse von ihrer chemischen Zusammensetzung recht gering. Sieht man ab von den Ergebnissen der Elementar-Analyse, so beschränken sie sich im wesentlichen auf die Resultate der Hydrolyse, die einerseits durch Säuren oder Alkalien und andererseits durch die Verdauungsfermente bewirkt werden kann. Außer Ammoniak entstehen dadurch aus allen Proteïnen nach und nebeneinander Albumosen, Peptone und schließlich Aminosäuren. Über die Natur der beiden ersten Spaltprodukte sind wir kaum besser unterrichtet als über die Proteïne selbst.

Um so erfolgreicher ist das bisherige Studium der Aminosäuren gewesen; denn für viele hat man nicht allein die Struktur feststellen, sondern auch die Synthese verwirklichen können. Auf dieser Basis wird deshalb die chemische Forschung weiter bauen müssen, die sich die Aufklärung und künstliche Reproduktion der Peptone, Albumosen und Proteïne zum Ziel gesetzt hat.

Von dieser Überzeugung durchdrungen, habe ich vor sechs Jahren, als ich den Entschluß faßte, mich dem Studium der Proteïne zu widmen, mit den Aminosäuren begonnen, um aus ihrer besseren Kenntnis neue Gesichtspunkte und Methoden für ihre komplizierteren Derivate zu gewinnen.

Der Erfolg hat meine Erwartungen nicht getäuscht. Zunächst gelang es durch Benutzung der Ester, eine neue Trennungsmethode für die Monoaminosäuren zu finden, die für die Hydrolyse der Proteïne ein wertvolles Hilfsmittel geworden ist und nicht allein die Isolierung der bekannten Aminosäuren erleichtert, sondern auch die Auffindung von neuen Gliedern der Klasse ermöglicht hat.

Noch wichtiger scheinen mir die auf dem gleichen Wege gefundenen Methoden zur Umwandlung der Aminosäuren in ihre amidartigen Anhydride, für die ich den Sammelnamen „Polypeptide“ gewählt habe. Die höheren Glieder dieser synthetischen Körperklasse sind in bezug auf äußere Eigenschaften, gewisse Farbenreaktionen, Verhalten gegen Säuren, Alkalien und Fermente, den natürlichen Peptonen so ähnlich, daß man sie als ihre nächsten Verwandten betrachten kann, und daß

ich ihre Gewinnung als den Beginn der Synthese der natürlichen Peptone und Albumosen bezeichnen möchte.

Da die weitere Verfolgung dieser Beobachtungen noch viele Jahre in Anspruch nehmen kann und andererseits das experimentelle Material schon jetzt einen erheblichen Umfang angenommen hat, so halte ich es für zweckmäßig, zur leichteren Orientierung einen Auszug daraus zu geben, der alle Publikationen bis zum Ende 1905 umfaßt. Ich werde mich dabei auf meine eigenen Untersuchungen und die damit im engen Zusammenhange stehenden Arbeiten im hiesigen Institut beschränken und fremde Versuche nur soweit berücksichtigen, als sie mir besonders wichtig oder historisch interessant erscheinen.

I. Aminosäuren.

Indem ich ihre Geschichte als bekannt voraussetze, will ich nur erwähnen, daß bei Beginn meiner Versuche 9 Monoaminosäuren, 3 Diaminosäuren und das schwefelhaltige Cystin als Spaltprodukte von Proteïnen bekannt waren.

Synthese der Monoaminosäuren.

Die Synthese war bereits realisiert bei den 8 Monoaminosäuren: Glykocoll, Alanin, α-Aminovaleriansäure, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin und Tyrosin, soweit es sich um die Racemkörper handelt.

Von den Methoden, die dazu benutzt wurden und die man in den Lehrbüchern der organischen Chemie zusammengestellt findet, sind zwei durch allgemeine Gültigkeit und praktische Brauchbarkeit ausgezeichnet: einerseits die Wechselwirkung zwischen Ammoniak und den α-Halogenfettsäuren und andererseits die von Strecker herrührende Cyanhydrinmethode, d. h. Vereinigung eines Aldehyds mit Blausäure und Ammoniak und nachfolgende Verseifung des Amino-cyanhydrins.

Ich habe beide wiederholt angewendet, um bekannte oder neue Aminosäuren zu gewinnen, und habe auch die erste Methode erweitert durch eine neue Darstellung der dafür erforderlichen α-Halogenfettsäuren. Sie besteht darin, die Monoalkylmalonsäure von der allgemeinen Formel $R.CH(COOH)_2$ zu bromieren und die dabei fast quantitativ entstehenden Bromprodukte von der Formel $R.CBr(COOH)_2$ durch Erhitzen in Bromfettsäuren zu verwandeln. Auf diese Art läßt sich z. B. die Isobutylmalonsäure mit guter Ausbeute in Leucin[1]) über-

[1]) E. Fischer u. W. Schmitz, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 351 [1906]. (*S. 205.*)*)

*) Die in Kursiv gedruckten Zahlen beziehen sich auf die Seiten dieses Buches.

führen. Praktische Bedeutung hat das Verfahren gewonnen für die Bereitung des Phenyl-alanins[1]), die meiner Ansicht nach bequemer ist, als die Synthese von Erlenmeyer jun.

Entdeckt wurde mit seiner Hilfe die bisher unbekannte γ-Phenyl-α-aminobuttersäure[2]), und ich kann es für alle diejenigen Fälle empfehlen, wo die betreffende Malonsäure leicht zu bereiten ist. Seine Verwendung für die Synthese der Diaminosäuren wird später besprochen werden.

Spaltung in die optischen Isomeren.

Mit Ausnahme des Glykocolls enthalten sämtliche Aminosäuren, die aus den Proteïnen entstehen, ein asymmetrisches Kohlenstoffatom, und sind deshalb, soweit sie in der Natur vorkommen, optisch-aktiv.

Im Gegensatz dazu liefert die Synthese die Racemform, und es bedarf noch besonderer Operationen, um aus ihr die optisch-aktiven Komponenten zu isolieren. Die letzte Aufgabe war nur in vereinzelten Fällen gelöst, am frühesten bei der Asparaginsäure; denn ihr Amid, das Asparagin, kann durch bloße Kristallisation des Racemkörpers aus Wasser in die beiden optischen Antipoden gespalten werden.

Unvollkommener waren die Resultate, welche E. Schulze und Boßhard[3]) bei dem racemischen Leucin und der racemischen Glutaminsäure, oder Engel bei der racemischen Asparaginsäure durch partielle Vergärung erzielten; denn sie konnten so nur die optischen Antipoden der in der Natur gewöhnlich vorkommenden Aminosäuren erhalten.

Ich habe deshalb eine neue Spaltungsmethode der Aminosäuren ausgearbeitet, welche darauf beruht, ihre Benzoylverbindungen, die starke Säuren sind, mit optisch-aktiven Basen zu verbinden und die beiden isomeren Salze durch Kristallisation zu trennen. Die aktiven Benzoylverbindungen liefern dann bei der Hydrolyse die entsprechenden aktiven Aminosäuren.

Auf diese Weise gelang es mir, das Alanin[4]), die α-Aminobuttersäure[5]), das Leucin[6]), die α-Amino-n-capronsäure[7]), das Phenylalanin[8]),

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3062 [1904]. (*S. 369.*)

[2]) E. Fischer u. W. Schmitz, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 351 [1906]. (*S. 209.*)

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 138 [1886].

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2454 [1899]. (*S. 90.*)

[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2390 [1900]. (*S. 136.*)

[6]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2370 [1900]. (*S. 119.*)

[7]) E. Fischer und R. Hagenbach, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 3764 [1901]. (*S. 144.*)

[8]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2383 [1900]. (*S. 132.*)

das Tyrosin[1]), die Asparaginsäure[2]) und die Glutaminsäure[3]) in die optischen Komponenten zu spalten und dadurch auch die Synthese der natürlichen optisch-aktiven Formen zu verwirklichen.

An Stelle der Benzoylverbindungen lassen sich auch andere Acylderivate, z. B. die Formylkörper[4]), für den gleichen Zweck verwenden, und diese bieten noch den besonderen Vorteil, daß die Rückverwandlung in Aminosäuren schneller und leichter vonstatten geht, und infolgedessen die Gefahr der Racemisierung vermindert wird.

Synthese der Diaminosäuren.

Im Gegensatz zu den Monoaminosäuren sind diese Körper der künstlichen Herstellung recht schwer zugänglich. Zwar gelang die Darstellung des Anfangsgliedes, der Diaminopropionsäure, aus α, β-Dibrompropionsäure und Ammoniak verhältnismäßig leicht[5]); dagegen fehlte es an Methoden, die homologen Substanzen, in denen die Aminogruppen weiter voneinander entfernt sind, zu gewinnen. Selbst wenn die entsprechenden Bromverbindungen bekannt sind, kann die Verwandlung in Diaminosäuren mißglücken, wie die Beobachtungen von Willstätter zuerst gezeigt haben, der aus α, δ-Dibromvaleriansäure beziehungsweise dem entsprechenden Dibrompropylmalonester durch Ammoniak an Stelle der erwarteten Diaminosäure die α-Pyrrolidincarbonsäure gewann[6]).

Bessere Resultate erhielt ich[7]) durch eine Modifikation der schönen Synthese, welche S. Gabriel mit Hilfe des Phtalimids ausgeführt hat. So diente für die Synthese der α, δ-Diamino-valeriansäure der von Gabriel beschriebene Phtalimidopropyl-malonsäureester als Ausgangsmaterial. Er nimmt in der Malongruppe leicht ein Bromatom auf. Durch Verseifung und Abspaltung von Kohlensäure erhält man weiter die Phtalimido-brom-valeriansäure,

$$C_6H_4\left\langle{CO \atop CO}\right\rangle N.CH_2.CH_2.CH_2.\underset{Br}{CH}.COOH,$$

und daraus entsteht endlich durch Ammoniak und nachträgliche Abspaltung der Phtalylgruppe die α, δ-Diamino-valeriansäure. Diese

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 3638 [1899]. (*S. 110.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2460 [1899]. (*S. 97.*)
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2464 [1899]. (*S. 101.*)
[4]) E. Fischer und O. Warburg, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 3997 [1905]. (*S. 149.*)
[5]) Klebs, Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 301 [1894].
[6]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 1160 [1900].
[7]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 454 [1901]. (*S. 211.*)

konnte als die racemische Form des natürlichen Ornithins gekennzeichnet werden, denn sie lieferte ein Benzoylderivat, das sich nur durch die optische Inaktivität von der durch Jaffé entdeckten Ornithursäure unterscheidet. Den naheliegenden Gedanken, die synthetische Benzoylverbindung nach der oben beschriebenen allgemeinen Methode in die optischen Komponenten zu spalten, habe ich leider wegen Mangel an Material nicht ausführen können; er ist aber einige Jahre später von Sörensen[1]) mit Erfolg aufgenommen worden. Damit ist die Synthese des natürlichen Ornithins und auch des natürlichen Arginins vollständig durchgeführt; denn das letztere entsteht, nach den Beobachtungen von E. Schulze und Winterstein[2]), durch Addition von Cyanamid an Ornithin.

Auf dieselbe Art wie die α,δ-Diamino-valeriansäure erhielt ich aus dem Phtalimidoäthyl-malonsäureester die α,γ-Diamino-buttersäure[3]), und man kann mit ziemlich großer Sicherheit voraussagen, daß der von Gabriel und Maaß dargestellte Phtalimidobutyl-malonsäureester bei der gleichen Behandlung die α,ε-Diamino-capronsäure (inaktives Lysin) liefern wird. Den letzteren Versuch habe ich nicht ausgeführt, weil es mir in Gemeinschaft mit F. Weigert[4]) inzwischen gelungen war, ein viel bequemeres Verfahren für die Synthese dieser Diaminosäure zu finden. Es beruht auf der Wechselwirkung, welche der schon von Blank nach der Methode Gabriels dargestellte γ-Cyanpropylmalonester, $NC.CH_2.CH_2.CH_2.CH(COOC_2H_5)_2$, durch salpetrige Säure erfährt. Unter Austritt von einem Carboxäthyl entsteht dabei der α-Oximido-δ-cyan-valeriansäureäthylester:

$$NC.CH_2.CH_2.CH_2.C(:N.OH).COOC_2H_5.$$

Wird diese Verbindung mit Alkohol und Natrium reduziert, so bildet sich in verhältnismäßig glatter Weise α,ε-Diamino-capronsäure, $H_2N.CH_2.CH_2.CH_2.CH_2.CH(NH_2).COOH$, die sich als identisch mit dem racemisierten Lysin erwiesen hat.

Für die völlige Synthese des natürlichen aktiven Lysins bleibt nur noch die Spaltung des Racemkörpers auszuführen, die aller Wahrscheinlichkeit nach auch nach meiner Methode mit Benutzung der Benzoyl- oder Formyl-Verbindung gelingen wird.

Einige Jahre nach meinen Publikationen hat S. P. L. Sörensen[5]) eine neue Synthese des Ornithins und Lysins beschrieben, die große

[1]) Compt. rend. d. trav. d. Laborat. Carlsberg VI.
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 3191 [1899].
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2900 [1901]. (*S. 222.*)
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3772 [1902]. (*S. 229.*)
[5]) a. a. O.

Ähnlichkeit mit meiner Methode hat. Er führt nämlich zuerst die Phtalimidogruppe in den Malonsäureester ein, läßt auf diese Verbindung Natriumalkylat und γ-Brompropyl-phtalimid beziehungsweise γ-Chlorbutyronitril einwirken und reduziert die letztere Substanz mit Alkohol und Natrium. Durch nachträgliche Abspaltung der Estergruppen, der Phtalylgruppen und eines Carboxyls gewinnt er dann schließlich die Diaminosäure. Für die Bereitung des inaktiven Ornithins scheint sein Verfahren mit dem meinigen gleichwertig zu sein. Bei der Darstellung des inaktiven Lysins läßt aber die Ausbeute zu wünschen übrig, und deshalb ist hier sicherlich das Verfahren von Weigert und mir als bequemer und billiger vorzuziehen. Wir haben danach ziemlich große Mengen (über 100 g) von inaktivem Lysinpikrat hergestellt, und dieses Material hat dann später Suzuki und mir für die Synthese von Lysyl-lysin und Lysinanhydrid gedient[1]).

Die dritte neue Methode zur Gewinnung von Diaminosäuren beruht auf der Wechselwirkung zwischen Ammoniak und den doppelt ungesättigten Säuren. So entsteht aus der Sorbinsäure beim Erhitzen mit starkem, wässerigem Ammoniak auf 150° eine neue Diaminocapronsäure[2]), die mit dem inaktiven Lysin isomer ist, deren Struktur aber noch nicht sicher festgestellt wurde. Sie ist ausgezeichnet durch die Neigung, bei höherer Temperatur unter Verlust von Ammoniak und Wasser in das Anhydrid einer Aminohexensäure von der Formel C_6H_9ON überzugehen.

Auf dieselbe Art entsteht aus der β-Vinyl-acrylsäure eine neue Diamino-valeriansäure[3]), die gleichfalls, wenn auch weniger leicht, bei der Destillation in das Anhydrid einer Aminopentensäure übergeht.

Synthese der Oxyaminosäuren.

Nachdem das von Cramer[4]) entdeckte Serin als regelmäßiges Spaltprodukt der Proteïne erkannt war[5]), und nachdem auch noch andere Oxyaminosäuren, wie die Oxypyrrolidin-carbonsäure, bei der Hydrolyse einzelner Proteïne aufgefunden waren[6]), lag der Gedanke

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 4181 [1905]. (*S. 446.*)

[2]) E. Fischer und F. Schlotterbeck, Berichte der d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2357 [1904]. (*S. 237.*)

[3]) E. Fischer und K. Raske, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 3607 [1905]. (*S. 243.*)

[4]) Journ. f. prakt. Chem. [1] **96**, 76 [1865].

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 222 [1902] (*S. 687 u. 690*); **36**, 473 [1902] (*S. 712 u. 713*); **39**, 156 [1903]. (*S. 729.*)

[6]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2660 [1902]. (*S. 680.*)

nahe, eine Synthese für derartige Produkte zu suchen; denn die Methoden, die zur künstlichen Herstellung des Tyrosins gedient hatten, konnten für die aliphatischen Verbindungen nicht in Betracht kommen. Gleichzeitig schien eine neue Untersuchung über die Struktur des Serins und sein Verhältnis zu dem künstlich gewonnenen Isoserin nötig.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Versuche von H. Leuchs und mir, welche in der Abhandlung „Synthese des Serins, der *l*-Glucosaminsäure und anderer Oxyaminosäuren"[1]) beschrieben sind.

Es gelang uns nämlich, die Streckersche Methode auf die Oxyaldehyde anzuwenden. Aus Glykolaldehyd wurde das Serin gewonnen. Als Zwischenprodukt entsteht dabei aller Wahrscheinlichkeit nach das Amino-cyanhydrin, $CH_2(OH).CH(NH_2).CN$, das aber nicht isoliert wurde. Für das Serin ergab sich aus dieser ersten Synthese die schon früher gebrauchte, aber keineswegs bewiesene Strukturformel $CH_2(OH).CH(NH_2).COOH$, die überdies noch durch die Reduktion des Serins mit Jodwasserstoff zum α-Alanin bestätigt werden konnte. Da das Isoserin bei gleicher Reduktion β-Alanin lieferte, so war auch seine Struktur endgültig festgelegt.

Etwas später hat E. Erlenmeyer jun. eine andere Synthese des Serins beschrieben[2]), die zu demselben Schlusse bezüglich der Struktur führt.

Eine dritte, noch nicht publizierte Synthese, die nur eine Modifikation der ersten ist, wurde in jüngster Zeit von H. Leuchs und W. Geiger im hiesigen Institut aufgefunden und ist im Gegensatz zu den beiden ersten Methoden für die praktische Darstellung des Serins zu empfehlen.

Viel leichter als der Glykolaldehyd läßt sich das Aldol nach der Cyanhydrinmethode in die entsprechende α-Amino-γ-oxyvaleriansäure, $CH_3.CH(OH).CH_2.CH(NH_2).CO_2H$, verwandeln; diese ist ebenso wie die gewöhnlichen γ-Oxysäuren durch die Neigung zur Anhydridbildung ausgezeichnet, denn sie verwandelt sich schon bei der Behandlung mit Alkohol und Salzsäure in das Hydrochlorat einer Base $C_5H_9O_2N$, die wir als das Lacton:

$$\begin{array}{l} CH_3.\underset{|}{CH}.CH_2.CH(NH_2).\underset{|}{CO} \\ \quad\;\; O \text{———————————} \end{array}$$

auffaßten. Letzteres zeigt eine merkwürdige Polymerisation; es geht schon bei gewöhnlicher Temperatur in eine feste Substanz

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3787 [1902]. (*S. 251.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3769 [1902].

über, welche die gleiche empirische Zusammensetzung, aber das doppelte Molekulargewicht hat, und die wir glaubten als das Diketopiperazin:

$$
\begin{array}{lll}
 & \mathrm{NH} & \\
 & \diagup\ \diagdown & \\
\mathrm{CH_3.CH(OH).CH_2.CH} & & \mathrm{CO} \\
 & \mathrm{CO} & \mathrm{CH.CH_2.CH(OH).CH_3} \\
 & \diagdown\ \diagup & \\
 & \mathrm{NH} &
\end{array}
$$

betrachten zu müssen.

Endlich konnten wir die synthetische Methode auch auf die Zuckerarten anwenden. Am leichtesten war der Versuch bei der Galactose, weil die hier in ziemlich guter Ausbeute entstehende Galaheptosaminsäure, $CH_2(OH).[CH.OH]_4.CH(NH_2).COOH$, wegen ihrer geringen Löslichkeit in Wasser bequem zu isolieren ist.

Ungleich interessanter aber war das Resultat bei der *l*- und *d*-Arabinose; denn hier resultieren die *l*- und die *d*-Glucosaminsäuren $CH_2(OH).[CH.OH]_3.CH(NH_2).COOH$, von denen die *d*-Verbindung sich identisch mit dem Oxydationsprodukt des Glucosamins zeigte. Da umgekehrt die Glucosaminsäuren sich wieder zum Zuckerderivat reduzieren ließen, so war damit die totale Synthese des physiologisch so wichtigen Glucosamins verwirklicht und gleichzeitig seine Konstitution endgültig festgestellt.

Es ist kaum zu bezweifeln, daß man mit Hilfe dieser Methode noch zahlreiche glucosaminähnliche Derivate der Zuckerarten gewinnen kann, und ich halte diese Versuche keineswegs für überflüssig, da aller Wahrscheinlichkeit nach solche Produkte in größerer Zahl in der Natur zu finden sind.

Eine ganz andere Methode zur Synthese der aliphatischen Oxyaminosäuren hat kürzlich Sörensen[1]) gefunden. Sie schließt sich aufs engste an seine Synthese der Diaminosäuren an. So gelang es ihm, aus dem γ-Brompropyl-phtalimidomalonester die δ-Oxy-α-aminovaleriansäure zu gewinnen, die mit der obenerwähnten, aus Aldol entstehenden Verbindung isomer ist. Ich werde später auf diese interessante Substanz zurückkommen.

Schließlich erwähne ich noch die Synthese von zwei Oxypyrrolidincarbonsäuren, welche H. Leuchs[2]) im hiesigen Institut ausgeführt hat, und bei der ebenfalls ein Malonester-Derivat als Ausgangsmaterial diente.

---

[1]) a. a. O.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 1937 [1905].

Derivate der Aminosäuren.

Um neue Methoden für die Isolierung, Erkennung, Reinigung, Trennung und Kondensation der Aminosäuren zu gewinnen, habe ich eine Reihe von Derivaten studieren müssen, über deren Darstellung, Eigenschaften und Benutzung folgende allgemeine Bemerkungen orientieren sollen.

Acylverbindungen.

Am bekanntesten sind die Benzoylverbindungen der Aminosäuren, an deren Spitze die Hippursäure steht. Sie läßt sich synthetisch recht gut durch Schütteln einer alkalischen Lösung von Glykocoll mit Benzoylchlorid bereiten. Aber dieses einfache Verfahren gibt schlechte Resultate bei den kohlenstoffreicheren Aminosäuren. Ich habe es deshalb modifiziert durch Anwendung von Natriumbicarbonat an Stelle von Natronlauge und mit dieser Abänderung nicht allein für die gewöhnlichen Aminosäuren — Alanin, Leucin, α-Aminobuttersäure, α-Amino-*n*-capronsäure —, sondern auch für die Asparagin- und Glutaminsäure recht gute Resultate erhalten[1]). Daß diese Benzoylverbindungen für die Spaltung der racemischen Aminosäuren in die optischen Komponenten verwendet wurden, ist bereits erwähnt. Man kann sie auch in einzelnen Fällen zur Charakterisierung der Aminosäuren benutzen.

Noch leichter als die Benzoylverbindungen lassen sich die Formylderivate[2]) bereiten, denn sie entstehen in guter Ausbeute beim bloßen Kochen der Aminosäuren mit trockner Ameisensäure.

Auch sie sind für die Spaltung in die optischen Komponenten geeignet, wie an dem Beispiel des Formylleucins gezeigt wurde, und sie bieten den besonderen Vorteil, daß sie sich recht leicht durch Säuren oder Alkalien in die Aminosäuren zurückverwandeln lassen. Infolgedessen ist die Gefahr der partiellen Racemisierung bei ihnen geringer, als bei den Benzoylkörpern.

Weniger wichtig sind die Acetylverbindungen. Von ihnen kennt man nur die zuerst von Kraut und Hartmann beschriebene Acetursäure, die Th. Curtius[3]) später durch Kochen von Glykocoll mit Essigsäureanhydrid erhielt, und das racemische Acetyl-leucin, das ich aus Leucinester und Essigsäureanhydrid gewann[4]). Zum Unterschied von der Formylverbindung bildet letzteres mit den Alkaloïden keine gut kristallisierenden Salze.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2453 [1899]. (*S. 89.*)

[2]) E. Fischer und O. Warburg, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 38, 3997 [1905]. (*S. 149.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **16**, 757 [1883].

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 449 [1901]. (*S. 190.*)

Noch leichter als die Benzoylderivate lassen sich die Verbindungen der Aminosäuren mit der Benzolsulfosäure darstellen, indem man deren Chlorid mit ihrer alkalischen Lösung schüttelt[1]). Besonders fällt hier die Schwierigkeit fort, das Benzolsulfoderivat von der gleichzeitig gebildeten Benzolsulfosäure zu trennen, da diese in Wasser sehr leicht löslich ist. In einzelnen Fällen, wie beim Leucin oder der α-Aminobuttersäure, können diese Benzolsulfoverbindungen wegen ihrer schönen Eigenschaften zur Kennzeichnung der Aminosäure benutzt werden.

Wichtiger für diesen Zweck sind aber die gleichen Derivate der β-Naphtalinsulfosäure[2]), weil sie in Wasser sich sehr schwer lösen. Man kann infolgedessen mit ihrer Hilfe die Aminosäuren aus sehr verdünnten und stark verunreinigten Lösungen isolieren, und das Verfahren ist nicht auf die einfachen Aminosäuren beschränkt, sondern gibt auch noch bei den Oxyaminosäuren, z. B. Serin und Oxyprolin, oder bei manchen Polypeptiden, z. B. Glycylglycin, und Alanylglycin, gute Resultate.

Infolgedessen ist es bereits wiederholt von den Physiologen zum Nachweis der Aminosäuren im Harn oder anderen tierischen Sekreten benutzt worden.

An Stelle der Naphtalinsulfosäure hat später Siegfried die 4-Nitrotoluol-2-sulfosäure[3]) empfohlen. Daß sie besondere Vorteile vor der β-Naphtalinsulfosäure haben soll, ist mir recht zweifelhaft. Ich will aber die Möglichkeit zugeben, daß in einzelnen Fällen, wo die β-Naphtalinsulfoderivate schlecht kristallisieren, ein solcher Ersatz nützlich sein kann. Selbstverständlich wird man dann aber auch unter der großen Zahl von Sulfosäuren noch eine weitere Auswahl treffen können.

Leider ist das Säure-Radikal in allen diesen Verbindungen recht fest gebunden, so daß sie der Hydrolyse noch größeren Widerstand leisten, als die Benzoylkörper.

Phenylisocyanat-Verbindungen.

Nach der Beobachtung von Paal[4]) verbinden sich die Aminosäuren in alkalischer Lösung mit Phenylisocyanat zu den sogenannten Phenylureïdosäuren. Aus dem Glykocoll entsteht z. B. die Phenylureïdo-essigsäure. Ich habe solche Verbindungen aus einer größeren

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2380 [1900] (*S. 128. 130. 139*) und **34**, 448 (*S. 189*). Vgl. Ihrfelt ebenda **22**, Ref. 692, und Hedin ebenda **23**, 3197 [1890].

[2]) E. Fischer und P. Bergell, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3779 [1902]. (*S. 196.*)

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 68 [1904].

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **27**, 974 [1894].

Anzahl von Aminosäuren dargestellt und auf ihre schönen Eigenschaften hingewiesen[1]). Etwas später hat dann A. Mouneyrat[2]) im hiesigen Institut gefunden, daß diese Verbindungen beim Eindampfen mit Salzsäure sehr leicht in ihre Anhydride, Derivate des Hydantoïns, übergehen, die ebenfalls schön kristallisieren und schärfere Schmelzpunkte als die ursprünglichen Ureïdosäuren haben. C. Neuberg und A. Manasse[3]) haben endlich die α-Naphtylisocyanat-Verbindungen für den gleichen Zweck empfohlen.

Ester.

Da sie bei meinen Arbeiten eine besonders wichtige Rolle gespielt haben und deshalb im nachfolgenden sehr häufig erwähnt werden müssen, so mag wohl ein historischer Rückblick auf ihre Entdeckung und Verwertung am Platze sein.

Die ersten bestimmten Angaben über Salze des Glykocoll-Methyl- und -Äthyl-Esters rühren von Kraut[4]) her, welcher die Natur der durch Einwirkung von Jodalkyl und Alkohol auf Glykocoll schon von G. v. Schilling gewonnenen Produkte richtig erkannte. Ihre Untersuchung blieb aber sehr lückenhaft, bis Theodor Curtius[5]) sich mit ihnen beschäftigte. Er zeigte, daß diese Verbindungen außerordentlich leicht durch Einwirkung von Äthyl- oder Methyl-Alkohol und gasförmiger Salzsäure auf Glykocoll entstehen, und ferner, daß man aus den schön kristallisierenden Hydrochloraten durch Silberoxyd in ätherischer Lösung die freien Ester isolieren kann, daß diese unzersetzt destillieren und stark basische Flüssigkeiten von großer Reaktionsfähigkeit sind. Er wandte das gleiche Verfahren auf das Alanin, Leucin, Tyrosin und die Asparaginsäure an, begnügte sich aber hier mit der Isolierung der Hydrochlorate, denn sie haben ihm bekanntlich als Material für seine ausgedehnten und erfolgreichen Studien über aliphatische Diazoverbindungen gedient.

Abgesehen von der Wirkung der salpetrigen Säure hat Curtius noch zwei Umwandlungen des Glykocoll-äthylesters untersucht. Die eine findet in wässeriger Lösung statt und führt zum Glycinanhydrid oder Diketopiperazin, die andere erfolgt beim bloßen Stehen des Esters und liefert die sogenannte Biuretbase, von der unten noch die Rede sein wird.

Die späteren Beobachtungen von Tafel, Lilienfeld, Röhmann, Weidel und Roithner über Salze anderer Aminosäuren haben nichts

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2381, 2386 [1900]. (*S. 129. 135.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2393 [1900]. (*S. 169.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2359 [1905].

[4]) Ann. d. Chem. **177**, 267 [1875]; **182**, 172 [1876].

[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **16**, 753 [1883]; **17**, 953 [1884]; ferner Curtius und Goebel, Journ. f. prakt. Chem. [2] **37**, 150 [1888].

prinzipiell Neues ergeben. Meine eigenen Beobachtungen knüpfen deshalb an die Arbeiten von Curtius an.

In der Überzeugung, daß diese Stoffe wegen der Fähigkeit, zu destillieren, für die Reinigung und Trennung der Aminosäuren brauchbar sein würden, habe ich mich zunächst bemüht, ein bequemeres Verfahren für die Bereitung der freien Ester aus ihren Salzen zu finden. Das gelang auf Grund der Beobachtung, daß die Ester bei niedriger Temperatur von Alkali verhältnismäßig langsam angegriffen werden. Man kann sie deshalb aus der konzentrierten wässerigen Lösung der Salze bei guter Akbühlung durch konzentriertes Alkali in Freiheit setzen und mit Äther extrahieren. Diese Operation gibt allerdings bei den in Wasser sehr leicht löslichen Estern des Glykocolls, Alanins und der Asparaginsäure nur dann gute Resultate, wenn man gleichzeitig die wässerige Flüssigkeit mit Kaliumcarbonat sättigt.

Mit Hilfe des Verfahrens lassen sich die Ester von Glykocoll, Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Asparagin- und Glutaminsäure verhältnismäßig leicht isolieren. Verluste sind allerdings unvermeidlich, da trotz der niederen Temperatur stets eine partielle Verseifung des Esters erfolgt.

Ganz unbrauchbar aber ist diese Methode beim Tyrosinester, der wegen der Phenolgruppe sich mit Alkali verbindet, und bei den Estern der Diaminosäuren. Hier gelangt man am besten zum Ziel, wenn man die salzsauren Salze, die keineswegs rein zu sein brauchen, sondern als rohe Sirupe zur Anwendung kommen können, in trocknem Methyl- oder Äthyl-Alkohol löst, dann maßanalytisch in einer kleinen Probe den Chlorgehalt bestimmt und nun die Hauptmenge mit der für das Chlor berechneten Menge von Natriummethylat versetzt[1]). Beim vorsichtigen Verdampfen der Flüssigkeit bleiben die Ester nebst Kochsalz zurück und können von diesem durch ein geeignetes Lösungsmittel, Äther, Essigester, Aceton usw., getrennt werden.

Für die Gewinnung des Tyrosinesters kann man auch das Hydrochlorat in wässeriger Lösung mit Kaliumcarbonat zersetzen und die Flüssigkeit mit Essigester ausschütteln.

Nach diesem Verfahren sind außer den bereits bekannten Glykocollverbindungen die Äthylester des racemischen und des *d*-Alanins, der α-Aminobuttersäure, des *dl*- und *l*-Leucins, der α-Amino-*n*-capronsäure, des *dl*-Phenyl-alanins, des *l*-Tyrosins, des Sarkosins, der Asparaginsäure und der Glutaminsäure im reinen Zustande gewonnen worden[2]). Von ihnen ist nur der Tyrosinester bei gewöhnlicher Temperatur kristalli-

---

[1]) E. Fischer und U. Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 4176 [1905]. (*S. 441.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 433 [1901]. (*S. 173.*)

siert. Ebenfalls im freien Zustand isoliert, aber nicht analysiert, sind die Ester der *dl*-Diamino-propionsäure, des *dl*-Lysins, des Arginins, des Histidins, des *dl*-Isoserins und des *dl*-Serins[1]); sie bilden leicht lösliche, stark alkalisch reagierende Flüssigkeiten.

Im unreinen Zustande habe ich auch den Äthylester des aktiven Prolins in Händen gehabt. Mißlungen ist die Veresterung bei der α-Amino-γ-oxyvaleriansäure[2]) und der Glucosaminsäure[3]), weil hier durch die Wirkung des Alkohols und der Salzsäure Lactone entstehen, vielleicht als Umwandlungsprodukte von intermediär gebildeten Estern.

Die Salze der Ester mit Mineralsäuren sind in der Regel in Wasser leicht löslich, kristallisieren aber manchmal, insbesondere aus der alkoholischen Lösung, recht schön. Verhältnismäßig schwer löslich in Wasser sind die Pikrate, die deshalb in vereinzelten Fällen zur Abscheidung und Identifizierung benutzt werden können. Hinderlich ist nur die große Neigung dieser Ester, mit Wasser, zumal in der Wärme, zu reagieren und die Aminosäuren zurückzubilden.

Im Gegensatz zu den Aminosäuren sind die Ester ausschließlich Basen und zeigen deshalb in ihren Reaktionen die größte Ähnlichkeit mit den gewöhnlichen primären Aminen. Ich habe das speziell für den Glykocollester gezeigt, der sich leicht mit Säurechloriden, Säureanhydriden, mit Halogenalkylen, Isocyanaten, Senfölen, Aldehyden, Ketonen, Schwefelkohlenstoff und Phosgen vereinigt. Genauer untersucht wurden seine Verbindungen mit Acetessigester, Acetyl-aceton, Acetonyl-aceton, Phenylsenföl, Phosgen und Schwefelkohlenstoff[4]).

Eine besonders interessante Reaktion der Ester ist ihre Verwandlung in Diketopiperazine, die zuerst von Curtius bei dem Glykocollester beobachtet wurde. Sie findet hier in konzentrierter wässeriger Lösung bei gewöhnlicher Temperatur statt. Anders verhalten sich die Homologen. Sie werden durch kaltes Wasser, allerdings recht langsam, in der Hauptmenge verseift und in Aminosäuren verwandelt. Läßt man sie aber in reinem Zustand stehen, so verwandeln sie sich im Laufe von Wochen oder Monaten partiell in das Diketopiperazin. Sehr viel rascher erfolgt diese Reaktion beim Erhitzen auf 160—180^0, und ich habe darauf eine ebenso bequeme wie ergiebige Methode zur Darstellung der Diketopiperazine von Alanin, α-Aminobuttersäure, Leucin, α-Amino-*n*-capronsäure, Phenylalanin und Tyrosin gegründet[5]). Etwas schwie-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 4173 [1905]. (*S. 438.*)

[2]) E. Fischer und H. Leuchs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3800 [1902]. (*S. 259.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 28 [1903]. (*S. 270.*)

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 437 ff. [1901]. (*S. 177.*)

[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 442 ff. [1901]. (*S. 183. 185. 188. 191. 192.*)

riger ist die Reaktion bei dem Asparaginsäure-diäthylester zu leiten. Sie gelingt hier am besten beim längeren Kochen unter 15 mm Druck bei Gegenwart von wenig Zinkchlorid, liefert aber selbst dann nur 15% der theoretischen Ausbeute[1]).

Es verdient hervorgehoben zu werden, daß die Methylester die Umwandlung in Diketopiperazine viel leichter erfahren, als die Äthylverbindungen[2]).

Bei der Glutaminsäure ist bisher der Vorgang nicht beobachtet worden, weil ihr Ester zu große Neigung hat, in den Ester der Pyrrolidoncarbonsäure überzugehen.

Endlich verdient noch die Wechselwirkung zwischen den Estern und dem Ammoniak erwähnt zu werden. Reines flüssiges Ammoniak erzeugt bei gewöhnlicher Temperatur größtenteils Amid, und es gelang so, auch sehr empfindliche Amide, z. B. das bisher unbekannte Diamid der Asparaginsäure, darzustellen[3]). In alkoholischer Lösung erzeugt aber Ammoniak auch manchmal Diketopiperazine. So entsteht bei dem Asparaginsäure-diäthylester ausschließlich das zu dieser Klasse gehörige Asparaginimid.

So lange ich mich mit dem Problem, die Aminosäuren peptidartig zu verkuppeln, beschäftige, ist mir besonders wünschenswert erschienen, ihre wahren Chloride, die an Stelle des Carboxyls die Gruppe COCl enthalten, herstellen zu können. Aber manche Versuche mißglückten, weil es an einem passenden Lösungsmittel für die Aminosäuren und den Chlorphosphor fehlte. Erst die Erfahrungen, die ich mit den Acylderivaten sammeln konnte, haben mich auf den richtigen Weg geführt.

Den ersten Erfolg brachte die Benutzung des Thionylchlorids bei den Carbäthoxylderivaten des Glycylglycins[4]) und etwas später des Glykocolls[5]). Obschon die Reaktion keineswegs glatt verläuft und deshalb auch nur unreine Produkte liefert, so ließ sie sich doch auf einige andere Acylverbindungen, z. B. das *β*-Naphtalinsulfo-glycin und das *β*-Naphtalinsulfo-*d*-alanin, übertragen[6]). Dagegen versagte sie in anderen Fällen, weil das Thionylchlorid erst bei höherer Temperatur wirkt und hier manche der Chloride schon zersetzt werden. Besser wurden die

---

[1]) E. Fischer und E. Königs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4601 [1904]. (*S. 419.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 455 [1906]. (*S. 552.*)

[3]) E. Fischer und E. Königs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4599 [1904]. (*S. 417.*)

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2099 [1903]. (*S. 307.*)

[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2109 [1903]. (*S. 316.*)

[6]) E. Fischer und P. Bergell, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2594 [1903]. (*S. 574.*)

Resultate, als ich an Stelle des Thionylchlorids das Phosphorpentachlorid setzte und als Lösungsmittel Acetylchlorid benutzte. Auf diese Art gelang zuerst die Chlorierung des Bromisocapronyl-glycins[1]), dann des Bromisocapronyl-glycyl-glycins sowie der Hippursäure, und alle diese Produkte konnten, wie ich später ausführlich schildern werde, für die Gewinnung von Polypeptiden oder deren Acylderivaten benutzt werden[2]).

Der letzte Erfolg dieser langen Versuchsreihe war endlich die Gewinnung der Aminosäurechloride selbst, die bei der Reaktion als Hydrochlorate entstehen. Die Struktur dieser Körper habe ich durch die allgemeine Formel $\underset{\dot{N}H_3Cl}{R.CH.COCl}$ ausgedrückt, weil ich glaube, daß sie am einfachsten ihre Entstehung und ihre Verwandlungen darzustellen erlaubt.

Bisher wurde das Verfahren nur auf die Monoamino-monocarbonsäuren angewendet, hat aber hier ausnahmslos zum Ziele geführt. Die Operation besteht darin, daß die fein gepulverte Aminosäure mit etwa der 10—15-fachen Menge Acetylchlorid und der berechneten Menge Phosphorpentachlorid bei 0—20^0 geschüttelt wird. Die Aminosäure verschwindet dabei allmählich, und an ihre Stelle tritt das schwer lösliche Hydrochlorat des Aminosäurechlorids. Bei einigen Aminosäuren, namentlich beim Glykocoll, bedarf es allerdings einer besonderen Vorbereitung für diese Reaktion, d. h. die Aminosäure muß aus der warmen, wässerigen Lösung durch Alkohol gefällt und dann selbstverständlich scharf getrocknet werden. Mit solchem Material gelingt es, die Chlorierung so glatt durchzuführen, daß das Produkt nahezu den theoretischen Chlorgehalt besitzt.

Ganz anders ist das Resultat, wenn man das aus Wasser kristallisierte Glykocoll auch nach feinster Pulverung und sorgfältigstem Trocknen verwendet, da dann gar kein salzsaures Glycylchlorid erhalten wird. Die Ursache dieser merkwürdigen Verschiedenheit ist noch nicht aufgeklärt[3]). Analysiert sind bis jetzt die Chlorderivate des Glykocolls, des *dl*- und *d*-Alanins, der *dl*-Amino-buttersäure, des *dl*-Leucins und des *dl*-Phenyl-alanins.

Größere Schwierigkeiten haben sich bei den Diamino- und Oxyaminosäuren gezeigt, weil hier phosphorhaltige Nebenprodukte entstehen, die die Isolierung der richtigen Chloride sehr erschweren. Auch für Asparagin- und Glutaminsäure sind die Versuche noch nicht abgeschlossen. Trotzdem bildet die Auffindung dieser Halogenderivate der Aminosäuren einen wesentlichen Fortschritt für die Synthese vieler

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3070 [1904]. (*S. 377.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 605 [1905]. (*S. 422.*)
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2917 [1905]. (*S. 540.*)

Derivate, insbesondere der Polypeptide; denn wie leicht begreiflich, besitzen diese Produkte eine ähnliche Reaktionsfähigkeit, wie die gewöhnlichen Säurechloride. Infolgedessen bietet auch ihre Erkennung keine Schwierigkeiten. Man braucht sie nur mit kaltem Alkohol zu übergießen, um sofort lebhafte Erwärmung, Lösung und Bildung von salzsaurem Aminosäureester zu beobachten.

Erkennung und Trennung der Aminosäuren.

Im reinen Zustande sind die bisher bekannten α-Amino- und Oxyaminosäuren schön kristallisierte Stoffe, deren Analyse keine Schwierigkeiten bietet. Trotzdem ist die Identifizierung kleinerer Mengen, besonders wenn es sich um Unterscheidung von Isomeren handelt, bei dem Mangel an einem scharfen Schmelzpunkt nicht so einfach. Außerordentlich schwierig aber kann die Aufgabe werden, wenn es sich um kompliziertere Gemische handelt, zumal wenn diese noch durch andere Substanzen, wie anorganische Salze u. dgl., verunreinigt sind.

Für die Trennung solcher Gemische war man früher auf die Kristallisation aus wässeriger oder wässerig-alkoholischer Lösung angewiesen, und jedermann, der sich mit derartigen Versuchen beschäftigt hat, mußte die Unvollkommenheit und Unsicherheit des Verfahrens beklagen. Aus diesem Grunde habe ich den Vorschlag gemacht, zur Abscheidung und Trennung die Ester zu benutzen. Das Verfahren wird später bei der Besprechung der Proteïne ausführlicher behandelt werden. Die Destillation der Ester bietet den großen Vorteil, daß dadurch alle anorganischen Stoffe und auch die komplizierteren Aminosäuren, wie die Diaminosäuren, die hochmolekularen Oxyaminosäuren, sowie polypeptidartige Produkte leicht entfernt werden.

Ferner wird durch die fraktionierte Destillation eine schon ziemlich weitgehende Trennung der Ester erreicht, und diese läßt sich noch verschärfen, indem man die verschiedene Löslichkeit der Ester in Wasser, Äther und Petroläther benutzt.

Die aus den Estern regenerierten Aminosäuren sind also schon relativ rein und können dann durch spezielle Methoden in leicht definierbare Derivate verwandelt werden. Als solche habe ich in manchen Fällen die Phenylisocyanatverbindungen und die daraus hervorgehenden Hydantoïne mit Vorteil benutzt. In anderen Fällen leisten die β-Naphtalinsulfoverbindungen noch bessere Dienste. Daß auch die früher viel gebrauchten Kupferverbindungen mit zu benutzen sind, ist selbstverständlich.

Nur eine der bekannteren Aminosäuren, das Prolin, ist in absolutem Alkohol leicht löslich und kann dadurch verhältnismäßig leicht von seinen Verwandten getrennt werden.

Die Phenylisocyanat- und Naphtalinsulfoverbindungen lassen sich auch häufig zur Isolierung der Aminosäuren aus wässerigen, durch andere Stoffe verunreinigten Lösungen benutzen. Handelt es sich um sehr verdünnte Lösungen, wie Harn, so wird man den Naphtalinsulfoverbindungen wegen ihrer geringen Löslichkeit den Vorzug geben. Ohne dieses Hilfsmittel wäre es trotz der Estermethode sehr schwer gewesen, das Serin unter den Spaltprodukten mancher Proteïne zu erkennen.

Für die Diaminosäuren ist bekanntlich die Fällung mit Phosphorwolframsäure das wichtigste Abscheidungsmittel, aber nach meiner Erfahrung bedarf es bei Anwendung dieser Methode bestimmter Vorsichtsmaßregeln. Die Phosphorwolframate der Monoaminosäuren, z. B. des Glykocolls und des Alanins, sind keineswegs so leicht löslich, wie man im allgemeinen annimmt. Ich habe gefunden, daß die Verdünnungsgrenze (5%), welche E. Schulze und Winterstein[1]) für Glykocoll angaben, nicht mehr gültig ist, wenn die Lösungen einige Zeit stehen, wie das ja bei größeren Fällungen und Filtrationen gar nicht zu vermeiden ist; denn selbst 2-prozentige Lösungen von Glykocoll und Alanin, die außerdem 10% Schwefelsäure enthalten, geben mit einer sehr konzentrierten Lösung von Phosphorwolframsäure nach längerem Stehen kristallinische Niederschläge, deren Menge allerdings ziemlich klein ist.

Endlich ist die Gefahr recht groß, daß die Monoaminosäuren von den fallenden Phosphorwolframaten der Diaminoverbindungen mitgerissen werden, und schließlich verdient es noch betont zu werden, daß das Auswaschen der Niederschläge bei größeren Operationen nicht so leicht ist.

Ich halte es deshalb für zweckmäßig, den Phosphorwolframsäure-Niederschlag stets stark abzupressen[2]), wieder mit Wasser zu verreiben und dann die Filtration und Pressung zu wiederholen. Zur völligen Entfernung der Monoaminosäure ist es dann ratsam, den Niederschlag mit Baryt zu zerlegen und in der vom Baryt befreiten Lösung die Fällung mit Phosphorwolframsäure zu wiederholen. Daß dabei ein Teil der Diaminosäuren durch ihre Löslichkeit verloren geht, ist unvermeidlich, fällt aber auch nur für quantitative Versuche ins Gewicht.

Für Lysin, Arginin und Histidin besitzen wir außer der Fällung mit Phosphorwolframsäure die vortrefflichen, namentlich von Kossel und seinen Schülern ausgearbeiteten Isolierungsmethoden, denen ich nichts zuzufügen habe. Anders aber steht es mit den in neuerer Zeit erst entdeckten Stoffen, die durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, z. B. der von Abderhalden und mir im Caseïn gefundenen Diamino-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 574 [1901].

[2]) E. Fischer und E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 88 [1903].

(*S. 722.*)

trioxy-dodekansäure, die wahrscheinlich mit Skraups Caseïnsäure identisch ist, aber die von uns aufgestellte Formel besitzt. Sie wird zwar durch Phosphorwolframsäure sehr leicht gefällt, aber nicht mehr in den Verdünnungen, wo Arginin und Lysin noch ausfallen. Ähnliche, bisher noch nicht im reinen Zustande isolierte Körper sind nach meinen Erfahrungen noch mehr unter den hydrolytischen Spaltprodukten des Caseïns und anderer Proteïne vorhanden.

Speziellere Methoden für den Nachweis einzelner Aminosäuren sind in der folgenden Zusammenstellung erwähnt, welche in registerartiger Kürze alle Beobachtungen enthält, die von mir und den Angehörigen des hiesigen Instituts in bezug auf Darstellung, Eigenschaften und Derivate dieser Stoffe gemacht wurden. Der Kürze halber sind bei den Literaturangaben „Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft" mit „B.", „Liebigs Annalen" mit „A." und Zeitschrift für physiologische Chemie" mit „Z." bezeichnet.

Glykocoll. Darstellung des Äthylesters aus dem Hydrochlorat durch Alkali und Kaliumcarbonat (B. **34**, 436. *S. 177.*). Der dort angegebene Siedepunkt des Esters (43—44° bei 11 mm Druck) ist zu niedrig. Er wurde später für ein analysiertes Präparat unter 10 mm Druck bei 51,5—52,5° beobachtet und liegt also auffallenderweise etwas höher als der Siedepunkt des Alaninesters (48,5° bei 10—11 mm). Verbindungen des Esters mit Acetessigester, Acetyl-aceton, Acetonylaceton, Phenylsenföl, Phosgen und Schwefelkohlenstoff (B. **34**, 437 ff. *S. 177 ff.*). Qualitativer Nachweis mittels Äthylesterchlorhydrat (Z. **33**, 156. *S. 637.*). Abscheidung und quantitative Bestimmung von Glykocollester-chlorhydrat (Z. **33**, 183, *S. 658*, und **35**, 230, *S. 693*; ferner **35**, 72. *S. 674*). β-Naphtalinsulfo-glycin (B. **35**, 3779. *S. 197.*). γ-Phenylhydantoïn aus Glykocoll (B. **33**, 2394. *S. 169*). Salzsaures Glycylchlorid (B. **38**, 2915. *S. 539.*). Hippursäure, Nichtspaltbarkeit durch Alkaloïde (B. **32**, 2470. *S. 107.*). Hippurylchlorid (B. **38**, 612. *S. 429*). Die zahlreichen Verbindungen des Glykocolls mit halogenhaltigen Acylen sind später bei den Polypeptiden erwähnt.

Sarkosin. Äthylester (B. **34**, 452. *S. 193.*).

Alanin. Spaltung des Racemkörpers in die optischen Komponenten, Beschreibung der letzteren; ferner Darstellung des *dl*-, *d*- und *l*-Benzoylalanins (B. **32**, 2454 ff. *S. 90.*). Äthylester und seine Verwandlung in das Lactimid oder Dimethyl-diketopiperazin (B. **34**, 442. *S. 182.*). Abscheidung des Alanins durch die Estermethode (Z. **33**, 157, *S. 638*, und 184, *S. 660*). Verwandlung von *d*-Alanin in *d*-Milchsäure (Z. **33**, 190, *S. 664.*). Darstellung des *d*-Alanins aus Seide (B. **39**, 462. *S. 559.*). β-Naphtalinsulfoderivat des *d*-Alanins und des racemischen Alanins (B. **35**, 3781. *S. 198.*). Salzsaures Alanylchlorid (B. **38**, 618,

S. 436, und 2917, *S. 541*). Carbäthoxylalanin nebst Ester, Amid und Chlorid (A. **340**, 137ff. *S. 474.*).

α-Amino-buttersäure. Darstellung, Benzoyl- und Benzolsulfoderivat; ferner Spaltung in die beiden optischen Komponenten und deren Eigenschaften (B. **33**, 2387ff. *S. 136ff.*). Äthylester und seine Verwandlung in das entsprechende Diketopiperazin (B. **34**, 443. *S. 183.*).

α-Amino-isovaleriansäure. Darstellung des Racemkörpers nebst Äthylester, Benzoyl- und Phenylisocyanatderivat; ferner Derivate der α-Amino-*n*-valeriansäure, der α-Amino-methyl-äthylessigsäure und der β-Aminoisovaleriansäure (B. **35**, 400. *S. 158*). Auffindung der aktiven Amino-isovaleriansäure im Caseïn (Z. **33**, 157, *S. 638*) und im Horn (Z. **36**, 469. *S. 708.*).

Leucin. a) Racemkörper. Darstellung, Benzoyl-, Benzolsulfo- und Phenylisocyanatverbindung; ferner Spaltung in die optischen Komponenten (B. **33**, 2370ff. *S. 119ff.*). Verwandlung in Phenyl-isobutylhydantoïn (B. **33**, 2395. *S. 171.*). Äthylester und seine Verwandlung in Leucinimid; ferner Acetylderivat (B. **34**, 449. *S. 185. 188. 190.*). Salzsaures Leucylchlorid (B. **38**, 615. *S. 432.*). β-Naphtalinsulfoderivat (B. **35**, 3782. *S. 200.*).

b) *l*-Leucin (natürliches). Synthetische Bereitung aus dem Racemkörper mittels der Benzoylverbindung (B. **33**, 2378. *S. 125*) oder der Formylverbindung (B. **38**, 3997. *S. 153*) oder des Äthylesters (Warburg, B. **38**, 187). Optisches Verhalten (B. **33**, 2379, *S. 127*) und B. **38**, 4003ff. *S. 155.*). Benzoylderivat (B. **33**, 2377. *S. 125.*). Äthylester (B. **34**, 445. *S. 185.*). β-Naphtalinsulfoderivat (B. **35**, 3783. *S. 200.*).

d-Leucin. Darstellung aus dem Racemkörper mittels der Benzoylverbindung (B. **33**, 2375. *S. 123*), mittels der Formylverbindung (B. **38**, 3997. *S. 153.*).

α-Amino-*n*-capronsäure. Benzoyl- und Benzolsulfoverbindungen (B. **33**, 2382. *S. 130.*). Spaltung in die optischen Komponenten mittels der Benzoylverbindung (B. **34**, 3764. *S. 144.*). Äthylester (B. **34**, 450. *S. 190.*).

Phenyl-alanin. a) Racemkörper. Darstellung nach dem Verfahren von Erlenmeyer jun.; ferner Spaltung in die optischen Isomeren mittels der Benzoylverbindung (B. **33**, 2383ff. *S. 132ff.*). Darstellung aus der Benzylmalonsäure (B. **37**, 3064. *S. 372.*). Äthylester und seine Verwandlung in das Diketopiperazin (B. **34**, 450. *S. 191.*). β-Naphtalinsulfoderivat (B. **35**, 3783. *S. 200.*). Salzsaures Phenylalanylchlorid (B. **38**, 2918. *S. 542.*).

b) *d*-Phenyl-alanin. Darstellung aus dem Racemkörper; optisches Verhalten und Phenylisocyanatverbindung (B. **33**, 2385. *S. 134.*). Umwandlung in Phenylbenzylhydantoïn (B. **33**, 2396. *S. 171.*).

c) *l*-Phenyl-alanin. Isolierung und Nachweis mit der Estermethode unter den Spaltprodukten des Caseïns (Z. **33**, 171. *S. 650*), des Seidenfibroïns (Z. **33**, 188. *S. 663*), des Oxyhämoglobins (Z. **36**, 273. *S. 699.*). Nachweis kleiner Mengen durch die Bildung von Phenyl-acetaldehyd beim Kochen mit Bichromat und Schwefelsäure (Z. **33**, 174. *S. 652.*).

γ-Phenyl-α-aminobuttersäure. Synthese aus der Phenyläthyl-malonsäure und Eigenschaften (B. **39**, 355. *S. 209.*).

Tyrosin. Darstellung des racemischen Benzoyltyrosins nach der Methode von Erlenmeyer jun. und seine Spaltung in die optischen Komponenten. Ferner Synthese des natürlichen *l*-Tyrosins, sowie des *d*-Tyrosins und ihr optisches Verhalten (B. **32**, 3638. *S. 110 ff*). Dibenzoylderivat des *l*-Tyrosins (B. **32**, 2454. *S. 90.*). Gewinnung des *l*-Tyrosins aus Seidenfibroïn (Z. **33**, 181. *S. 657.*). *l*-Tyrosin-äthylester und seine Verwandlung in das entsprechende Diketopiperazin (B. **34**, 451. *S. 192.*).

Asparaginsäure. Spaltung des Racemkörpers in die optischen Komponenten mit Hilfe der Benzoylverbindung; ferner Benzoylierung und optisches Verhalten der *l*-Asparaginsäure (B. **32**, 2459 ff. *S. 96 ff.*). *l*-Asparaginsäure-diäthylester (B. **34**, 452. *S. 193.*). Darstellung desselben Esters aus Asparagin; ferner seine Verwandlung in Asparaginsäure-diamid, Asparagin und das Piperazinderivat (B. **37**, 4599 ff. *S. 417 ff.*).

Glutaminsäure. Spaltung des Racemkörpers in die optischen Komponenten mit Hilfe der Benzoylverbindung (B. **32**, 2464. *S. 101.*). *d*-Glutaminsäure-diäthylester (B. **34**, 453. *S. 194.*). Darstellung der *d*-Glutaminsäure aus Caseïn (Z. **33**, 153. *S. 635.*).

Prolin oder Pyrrolidin-α-carbonsäure. Neue Synthese des Racemkörpers; seine Phenylisocyanat-Verbindung und deren Anhydrid (B. **34**, 458. *S. 215.*). Entdeckung des aktiven *l*-Prolins unter den Spaltprodukten des Caseïns durch Salzsäure und seine Isolierung nach der Estermethode; Phenylisocyanatverbindung und deren Anhydrid, Racemisierung (Z. **33**, 167. *S. 643 ff.*). Entstehung des aktiven und racemischen Prolins bei der Hydrolyse des Caseïns durch Alkali (Z. **35**, 227. *S. 691.*). Bildung des *l*-Prolins bei der enzymatischen Spaltung des Caseïns (Z. **40**, 215. *S. 732.*). Praktische Darstellung des racemischen Prolins aus Gelatine (B. **37**, 3072. *S. 379.*).

Oxy-prolin. Entdeckung der aktiven Form unter den Spaltprodukten der Gelatine, Kristallform, Drehungsvermögen, Verbindung mit Phenylisocyanat und Reduktion zu Prolin (B. **35**, 2660. *S. 680.*). Nachweis unter den Spaltprodukten des Caseïns (Z. **39**, 156. *S. 729.*). Synthese von zwei inaktiven Oxypyrrolidincarbonsäuren (H. Leuchs, B. **38**, 1937).

Serin. Synthese, Phenylisocyanat-Verbindung, Reduktion zu α-Alanin (B. **35**, 3787. *S. 251 ff.*). Nachweis unter den Spaltprodukten des

Seidenfibroïns und optische Inaktivität (Z. **35**, 221 ff. *S. 687.*). Ich halte es für wahrscheinlich, daß in den Proteïnen die aktive Form des Serins enthalten ist, die vielleicht schlecht kristallisiert und deshalb schwer zu isolieren ist. Das inaktive Serin, das man bisher aus Proteïnen gewonnen hat, würde nach dieser Anschauung erst durch Racemisierung aus der aktiven Form entstehen. Es wäre deshalb interessant, die Racemform durch die Benzoylverbindung in die optischen Komponenten zu zerlegen.

Isoserin. Verbesserte Darstellung, Kupfersalz, Äthylester, Phenylisocyanat-verbindung und Reduktion zu β-Alanin (B. **35**, 3794 ff. *S. 255.*).

α-Amino-γ-oxy-valeriansäure. Synthese. Lacton und dessen Umwandlung in das polymere Di-β-oxypropyl-diketopiperazin. Phenylisocyanat-Verbindung und Reduktion zu α-Amino-valeriansäure (B. **35**, 3797. *S. 258 ff.*).

Galaheptosaminsäure. Synthese und Kupfersalz (B. **35**, 3801. *S. 262.*).

Glucosaminsäure. Synthese der *l*- und *dl*-Verbindung. Löslichkeit und Drehungsvermögen der aktiven Formen (B. **35**, 3802 ff. *S. 264.*). Synthese der *d*-Verbindung und des daraus durch Reduktion entstehenden *d*-Glucosamins (B. **36**, 24. *S. 267 ff.*).

α,β-Diamino-propionsäure. Methylester und seine Verwandlung in das Dipeptid (B. **38**, 4173. *S. 438*).

α,γ-Diamino-buttersäure. Synthese (B. **34**, 2900. *S. 222.*).

α,δ-Diamino-valeriansäure oder Ornithin. Synthese des Racemkörpers und seiner Benzoylverbindungen (B. **34**, 462 ff. *S. 219.*).

Eine zweite, ziemlich ähnliche Synthese ist später von Sörensen ausgeführt worden (a. a. O.). Er hat ferner die Dibenzoylverbindung nach meiner Methode in die optischen Komponenten zerlegt, so daß also jetzt auch die Synthese der beiden aktiven Ornithine und des aktiven Arginins verwirklicht ist.

Diamino-valeriansäure (unbekannter Struktur). Synthese aus β-Vinylacrylsäure (B. **38**, 3607. *S. 243.*).

α,ε-Diamino-capronsäure oder Lysin. Synthese des Racemkörpers, seine Monobenzoyl- und Dibenzoyl-Verbindung und das Phenylisocyanatderivat; ferner Racemisierung des aktiven Lysins (B. **35**, 3772 ff. *S. 229 ff.*). Methylester des racemischen Lysins und seine Verwandlung in das Anhydrid oder Diketopiperazinderivat (B. **38**, 4173. *S. 446.*).

Diamino-capronsäure (unbekannter Struktur). Darstellung aus Sorbinsäure und Eigenschaften (B. **37**, 2357 ff. *S. 237.*).

Arginin. Methylester und seine Kondensation. Praktische Darstellung des Arginins aus Edestin (B. **38**, 4186. *S. 453.*).

Histidin. Isolierung des Methylesters aus dem Hydrochlorat und seine Verwandlung in das Anhydrid (B. **38**, 4184. *S. 450.*).

Cystin. Identität von Proteïn- und Stein-Cystin. Optisches Verhalten und Dimethylester (Z. **45**, 405. *S. 273 ff.*).

II. Polypeptide.

Den Namen Polypeptide habe ich vorgeschlagen für die Produkte, die durch amidartige Verkettung von Aminosäuren entstehen, und deren einfachster Vertreter das Derivat des Glykocolls, das sogenannte Glycylglycin, $NH_2CH_2CO.NHCH_2COOH$, ist. Nach der Anzahl der in ihnen enthaltenen Aminosäuren sollen sie als Di-, Tri-, Tetra-Peptide usw. unterschieden werden. Diese Bezeichnung ist einerseits der Nomenklatur der Kohlehydrate nachgebildet, andererseits ist darin das alte Wort Pepton verwertet, denn ich habe von Anfang an erwartet, und ich bin durch alle nachfolgenden Beobachtungen in dieser Überzeugung bestärkt worden, daß diese künstlichen Produkte den natürlichen Peptonen sehr nahe verwandt sind, mit anderen Worten, daß die Peptone im wesentlichen ein bisher untrennbares Gemisch von Polypeptiden sind.

Da wegen dieser Beziehungen die synthetischen Körper ein weitgehendes Interesse beanspruchen dürfen, so habe ich mich im Laufe der letzten 4 Jahre eifrig bemüht, die Methoden für ihren Aufbau so vielseitig und leistungsfähig wie möglich zu gestalten, und es ist mir auch Dank der Hilfe einer größeren Anzahl von Mitarbeitern gelungen, eine stattliche Reihe solcher Stoffe im reinen Zustand zu gewinnen.

Da ich mich zu der Hoffnung berechtigt halte, daß diese Versuche den Beginn der Synthese in dem Gebiete der Peptone bedeuten, so scheint es mir angezeigt, bei ihrer zusammenfassenden Besprechung einen historischen Rückblick auf ältere Versuche in diesem Gebiete zu geben. An die Spitze desselben will ich ohne Änderung die Worte setzen, welche vor 5 Jahren als Einleitung zu der Beschreibung des ersten Polypeptides, des Glycylglycins, dienten.

„Der Gedanke, die aus den Proteïnstoffen durch Hydrolyse entstehenden Aminosäuren durch Anhydridbildung wieder zu größeren Komplexen zu vereinigen, ist schon seit längerer Zeit von verschiedenen Forschern experimentell behandelt worden. Wir erinnern nur an die Anhydride der Asparaginsäure von Schaal[1]), ihre Verwandlung einerseits in den colloïdalen Polyasparaginharnstoff von Grimaux[2]), andererseits an die Polyaspartsäuren von H. Schiff[3]), ferner an die

[1]) Ann. d. Chem. **157**, 24 [1871].
[2]) Bull. soc. chim. [2] **38**, 64 [1882].
[3]) Ann. d. Chem. **303**, 183 [1898] und **307**, 231 [1899].

Versuche von Schützenberger[1]) über die Vereinigung verschiedener Aminosäuren (Leucine und Leuceïne) mit Harnstoff durch Erhitzen mit Phosphorsäureanhydrid, an die ähnlichen Beobachtungen Lilienfelds[2]) über die Wirkung von Kaliumsulfat, Formaldehyd und anderen Kondensationsmitteln auf ein Gemisch von Aminosäureestern und endlich an die Angaben von Balbiano und Frasciatti[3]) über die Verwandlung des Glykocolls in ein hornartiges Anhydrid durch Erhitzen mit Glycerin. Aber alle von ihnen beschriebenen Produkte sind amorphe, schwer charakterisierbare Substanzen, über deren Struktur man ebensowenig wie über den Grad ihrer Verwandtschaft mit den natürlichen Proteïnstoffen etwas sagen kann.

Will man auf diesem schwierigen Gebiete zu sicheren Resultaten kommen, so wird man zuerst eine Methode finden müssen, welche es gestattet, successive und mit definierbaren Zwischenstufen die Moleküle verschiedener Aminosäuren anhydridartig aneinander zu reihen."

Außer den genannten Forschern hat sich dann noch Theodor Curtius mit der Verkettung von Aminosäuren beschäftigt, aber in der allergrößten Zahl seiner Versuche benutzte er als einen Komponenten nicht die freie Aminosäure, sondern deren Benzoylderivat. Obschon die so resultierenden Benzoylkörper ganz andere Eigenschaften als die freien Polypeptide besitzen und deshalb für die Chemie der Proteïne nur eine untergeordnete Bedeutung haben, so will ich doch die Versuche von Curtius, von denen er selbst eine historisch gehaltene Übersicht gegeben hat[4]), hier ebenfalls besprechen, weil es sich bei ihnen um kristallisierende, scharf definierbare Stoffe handelt.

Bereits im Jahre 1882 erhielt er durch Einwirkung von Benzoylchlorid auf Glykocollsilber außer Hippursäure noch zwei höher molekulare Säuren, von denen die eine als Hippurylamino-essigsäure, $C_6H_5CO . NHCH_2CO . NHCH_2COOH$, gekennzeichnet wurde. Sie ist also die Benzoylverbindung des von Fourneau und mir entdeckten Glycylglycins.

Die zweite, sogenannte γ-Säure, die in alkalischer Lösung mit Kupfersalzen eine biuretähnliche Färbung gibt, erhielt er im folgenden Jahre auch durch Zusammenschmelzen von Hippursäureester und Glykocoll. Aber erst 21 Jahre später, nachdem inzwischen von mir die freien Polypeptide entdeckt waren, gelang es Curtius und Benrath, die wahre Zusammensetzung der Verbindung, die Benzoyl-pentaglycylaminoessigsäure ist, festzustellen.

---

[1]) Recherches sur la synthèse des matières albuminoïdes et protéiques. Compt. rend. **106**, 1407 [1888] und Compt. rend. **112**, 198 [1891].

[2]) Dubois' Archiv **1894**, 383 und 555.

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2323 [1900] und **34**, 1501 [1901].

[4]) Journ. f. prakt. Chem. [2] **70**, 57 [1904].

Allerdings hatte Curtius schon 1884 darauf hingewiesen, daß bei der Einwirkung von Glykocollsilber auf Benzoylchlorid „neben Hippursäure eine Reihe von Säuren entsteht, in der jedes folgende Glied ein Glykocoll — $H_2O = NHCH_2CO$ mehr enthält als das vorhandene". Aber das war doch mehr eine theoretische Konzeption, als eine experimentelle Errungenschaft, da von keinem dieser höheren Glieder die Zusammensetzung richtig ermittelt war. Eine andere Versuchsreihe von Curtius, die nach meiner Ansicht für das Kapitel der Polypeptide größere Bedeutung hat, ist aus seiner Entdeckung des freien Glykocollesters hervorgegangen. Er fand in Gemeinschaft mit Goebel, daß dieser Ester in wässeriger Lösung in das Glycinanhydrid verwandelt wird: $NH\langle{}^{CH_2.CO}_{CO.CH_2}\rangle NH$, welches der einfachste Repräsentant der für die Chemie der Dipeptide so wichtigen Diketopiperazine ist. Er beobachtete ferner, daß der Glykocollester beim Aufbewahren eine Base liefert, welche ähnlich dem Biuret mit Alkali und Kupfersalzen eine schöne rote Farbe liefert und deshalb „Biuretbase" genannt wurde. Seine Angaben über Zusammensetzung und Eigenschaften der Verbindung, die er damals nicht rein gehabt hat, mußten allerdings später modifiziert werden.

Im Jahre 1901 fanden E. Fourneau und ich[1]) durch Aufspaltung des Glycinanhydrids mit Säuren das erste und einfachste Polypeptid, das schon erwähnte Glycyl-glycin nebst seinem Ester und der Phenylisocyanat-Verbindung, sowie dem Carbäthoxyl- und dem Carbaminoderivat seines Esters. Ein halbes Jahr später konnte ich den Nachweis führen[2]), daß bei dem Carbäthoxyl-glycyl-glycin noch eine dritte Aminosäure angefügt werden kann, indem man seinen Ester mit Leucinester zusammen erhitzt, wobei unter Alkoholaustritt der Carbäthoxyl-glycyl-glycyl-leucinester, $C_2H_5CO_2 . NHCH_2CO . NHCH_2CO . NH . CH(C_4H_9) . CO_2C_2H_5$, resultiert.

In derselben Abhandlung ist ein anderes Dipeptid, das Leucylleucin beschrieben, das aus dem schon länger als 50 Jahre bekannten Leucinimid durch Erhitzen mit konzentriertem Bromwasserstoff gewonnen wurde.

Einige Monate später erschien eine vorläufige Notiz von Curtius über eine neue Synthese des Hippurylglycins aus Hippurylazid und Glykocoll und die Benutzung der gleichen Methode zur Verlängerung der Glycinkette, wobei als Endprodukt die Benzoyl-pentaglycyl-aminoessigsäure, $C_6H_5CO.(NHCH_2CO)_5.NHCH_2COOH$, resultierte[3]).

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2868 [1901]. (*S. 279.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1095 [1902]. (*S. 290.*)
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3226 [1902].

Im Jahre 1903 gelang mir zum Teil in Gemeinschaft mit Otto zum ersten Male die Verwandlung des Carboxyls in die Säurechloridgruppe bei den Derivaten des Glykocolls und zwar durch gelindes Erwärmen des Carbäthoxylglycins mit Thionylchlorid. Das hierbei entstehende Carbäthoxylglycylchlorid konnte zwar nicht im analysenreinen Zustand gewonnen werden, ließ sich aber leicht mit Glycin- oder Alaninester verkuppeln, und durch Verseifung der zuerst entstehenden Ester konnten Carbäthoxyl-glycyl-glycin und Carbäthoxyl-glycyl-alanin isoliert werden.

Die Chlorierung mit Thionylchlorid war auch noch anwendbar bei den Carbäthoxylderivaten des Glycyl-glycins und des Diglycyl-glycins, und durch Verkupplung der Chloride mit Glycinester wurde dann als Endprodukt der Carbäthoxyl-triglycyl-glycin-ester gewonnen, der bei der Verseifung die Triglycyl-glycin-carbonsäure lieferte[1]):

$$HO_2C.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NH.CH_2.CO_2.H.$$

Diese und ähnliche Verbindungen standen den freien Polypeptiden schon näher, als die Benzoylderivate von Curtius, da sie nur das eine Carboxyl als fremden Bestandteil enthielten. Aber die Hoffnung, dieses als Kohlensäure abspalten zu können, wie man es nach dem Verhalten der Carbaminsäure und ähnlicher Substanzen erwarten mußte, hat sich leider nicht erfüllt. Ich habe deshalb in Gemeinschaft mit Otto[2]) einen anderen Weg eingeschlagen, um die freien Polypeptide zu gewinnen.

Glycyl-glycinester wurde zuerst mit Chloracetylchlorid kombiniert und das aus dem so resultierenden Ester durch Verseifung gewonnene Chloracetyl-glycyl-glycin durch Erwärmen mit Ammoniak in Diglycylglycin verwandelt.

$$NH_2.CH_2.CO.NHCH_2CO.NH.CH_2.CO_2.H.$$

Dieses Verfahren hat sich in der Folge als eine sehr fruchtbare Reaktion erwiesen, durch die sich die verschiedenartigsten Di-, Tri-, Tetra- und einzelne Penta-Peptide erhalten ließen.

Inzwischen war auch die Biuretbase von Curtius von neuem studiert worden. Schwarzschild[3]), der das Verhalten gegen Trypsin untersuchte, glaubte sie als den Äthylester eines Heptapeptids, d. h. des Hexaglycyl-glycins, betrachten zu müssen. Aber erst Curtius[4]) erkannte im Jahre 1904 ihre richtige Zusammensetzung und Struktur; er zeigte in überzeugender Weise, daß sie der Äthylester des Triglycyl-

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2094, 2106 [1903]. (*S. 302.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2106 [1903]. (*S. 315.*)
[3]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 155 [1903].
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1284 [1904].

glycins ist. Ich konnte diesen Schluß bald nachher bestätigen, da das von mir auf ganz anderem Wege gewonnene Triglycyl-glycin bei der Veresterung dieselbe Verbindung, resp. ihr Benzoylderivat lieferte[1]). Eine interessante, von Curtius erwähnte Veränderung erfährt der freie Ester nach einer Beobachtung seines Mitarbeiters Gumlich; denn ähnlich dem Glycinester geht er dabei in Anhydrid über[2]), das auch ebenso, wie es von mir und Fourneau für das Glycinanhydrid beobachtet wurde, durch Salzsäure aufgespalten wird und dabei ein Octapeptid des Glycins liefern soll.

Einen anderen Verlauf der Reaktion beobachtete ich anfangs 1906 bei dem Methylester des Diglycyl-glycins; denn hier entsteht der Methylester des Pentaglycyl-glycins, aus dem sich durch Verseifung leicht das Hexapeptid gewinnen läßt[3]).

Im Sommer 1904 hat endlich Theodor Curtius in einer Reihe von Abhandlungen[4]), die den gemeinsamen Titel „Verkettung von Aminosäuren" tragen, seine Synthesen von Benzoylderivaten der Polypeptide ausführlich beschrieben. Sie erstreckten sich auf die Derivate des Glykocolls, Alanins, Isoserins, der Asparaginsäure und β-Aminobuttersäure. Für die Synthese wurde stets die Azidmethode benutzt. Obschon sie auch noch manche interessante Beobachtungen — insbesondere über die Metamorphosen der Azide — enthalten, so kann ich doch auf ihren Inhalt nicht weiter eingehen, da alle Punkte erwähnt sind, die zu meinen Versuchen in Beziehung stehen.

Ungefähr um dieselbe Zeit fand ich[5]), daß das Bromisocapronyl-glycin auch mit Phosphorpentachlorid in sein Chlorid verwandelt werden kann, wenn man als Lösungsmittel Acetylchlorid benutzt, und daß die Kombination solcher Chlorkörper mit Aminosäureestern eine neue Synthese von Polypeptiden gestattet. Die Verfolgung dieser Beobachtung hat mich im Jahre 1905 zur Entdeckung der Chloride der Aminosäuren selbst geführt, die abermals eine neue und durch ihre Anwendung auf die optisch-aktiven Substanzen besonders wichtige Methode zum Aufbau der Polypeptide im Gefolge hatte[6]).

Synthetische Methoden.

Da das älteste Dipeptid, das Glycylglycin, zuerst aus dem Glycinanhydrid erhalten wurde und da auch heute noch manche Dipeptide

---

1) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2504 [1904]. (*S. 353 ff.*)
2) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1300 [1904].
3) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 453 [1906]. (*S. 567.*)
4) Journ. f. prakt. Chem. [2] **70**, 57 ff. [1904].
5) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3070 [1904]. (*S. 377.*)
6) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 605 [1905]. (*S. 422.*)

am leichtesten aus den 2,5-Diketopiperazinen[1]) darzustellen sind, so will ich zunächst die Bildungsweisen der letzteren besprechen, indem ich zugleich auf die von mir früher gegebene historische Übersicht[2]) ihrer Entdeckung verweise.

Das älteste Glied der Klasse ist wohl das sogenannte Leucinimid, welches zuerst von Bopp[3]) 1849 beobachtet und später auch künstlich aus dem Leucin durch Erhitzen im Kohlensäure-[4]) oder im Salzsäure-Strom[5]) erhalten wurde. Nach demselben Verfahren sind die Anhydride des Phenyl-glykocolls, Phenyl-alanins und Sarkosins dargestellt. Bezüglich der zahlreichen 2,5-Diketopiperazine mit zwei an Stickstoff gebundenen aromatischen Radicalen, die von P. W. Abenius und O. Widman sowie von C. A. Bischoff und seinen Mitarbeitern nach verschiedenen Methoden erhalten wurden, verweise ich auf die Lehrbücher[6]), da diese Verbindungen für das Studium der Proteïne nicht in Betracht kommen.

Eine zweite wichtige Bildungsweise fanden Curtius und Goebel bei dem Glykocoll-äthylester, denn dieser verwandelt sich in wässeriger Lösung zum großen Teil in das Anhydrid:

$$2\,NH_2.CH_2.COOC_2H_5 = 2\,C_2H_6O + NH\left\langle\begin{matrix}CH_2.CO\\CO.CH_2\end{matrix}\right\rangle NH\,.$$

Bei den kohlenstoffreicheren Aminosäuren erfolgt die Reaktion in wässeriger Lösung nicht oder nur in sehr geringem Maße, wohl aber, wie ich gefunden habe[7]), sehr langsam beim Aufbewahren und ziemlich rasch beim Erhitzen auf 150—180°. Das Verfahren ist sehr zu empfehlen für die Bereitung der Diketopiperazine von Alanin, Aminobuttersäure,

[1]) Dieser ursprünglich von C. A. Bischoff, sowie von Abenius und Widman gebrauchte Name (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1257 und 1662 [1888]) ist später durch Diaciperazin ersetzt worden. Ich habe letzteren ebenfalls so lange benutzt, bis A. Hantzsch, der die Silbe „*aci*“ für andere Zwecke reservieren will, wieder Diketopiperazin in Vorschlag brachte (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 998 [1905]). Obgleich Bedenken dagegen erhoben werden können und man nach einem Vorschlag, den mir Herr P. Jacobson privatim machte, vielleicht besser den von Kekulé herrührenden Ausdruck „Dioxo“ (vgl. Anschütz und Parlato, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **25**, 1977 [1892]) hier anwenden würde, so scheint es mir doch besser, vorläufig keine Änderung mehr vorzunehmen, weil dadurch stets einige Verwirrung gestiftet wird.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 435 [1901]. (*S. 175.*)

[3]) Ann. d. Chem. **69**, 28 [1849].

[4]) Hesse und Limpricht, Ann. d. Chem. **116**, 201 [1860].

[5]) Kohler, Ann. d. Chem. **134**, 367 [1865].

[6]) Z. B. Chemie der 6-gliedrigen, heterocyclischen Systeme von Brühl, Hjelt und Aschan, S. 1043.

[7]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 435 [1901]. (*S. 175.*)

Leucin, α-Amino-*n*-capronsäure, Phenyl-alanin und Tyrosin. Der gleiche Vorgang spielt sich rasch schon bei 100° ab bei dem Methylester des Histidins und Lysins[1]; langsam erfolgt er bei 100° auch bei dem Methylester des *d*-Alanins[2]. Mit einer kleinen Modifikation läßt er sich auch benutzen bei dem Asparaginsäure-diäthylester[3]; dagegen versagt er bei den Estern der Glutaminsäure, weil diese zu leicht in die Ester der Pyrrolidon-carbonsäure übergehen.

Eine dritte, recht glatt verlaufende und deshalb für die praktische Darstellung in vielen Fällen geeignete Methode beruht auf der Wechselwirkung zwischen Ammoniak und den Estern der Aminosäuren, die ein α-Halogenacyl enthalten. Sie wurde gefunden[4] bei dem Chloracetyl-alaninester und gab das erste gemischte Diketopiperazin:

$$Cl.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).CO_2C_2H_5 + 2\,NH_3$$

$$= NH_4Cl + C_2H_6O + NH\left\langle \begin{array}{l} CH_2.CO \\ \\ CO—CH.CH_3 \end{array} \right\rangle NH \quad .$$

Daß die Reaktion auch noch in komplizierteren Fällen eintritt, beweist die ziemlich glatte Verwandlung des Chloracetyl-asparaginsäureesters in Anhydro-glycyl-asparaginsäureester und Anhydro-glycyl-asparagin[5].

Als Zwischenprodukt entsteht aller Wahrscheinlichkeit nach der Ester des Dipeptids, der durch die weitere Wirkung des alkoholischen Ammoniaks in Diketopiperazin verwandelt wird.

Daß dieser letzte Prozeß in der Tat sehr leicht stattfindet, wurde zuerst bei dem Glycyl-glycinester[6] und später in zahlreichen anderen Fällen beobachtet und ist deshalb wichtig, weil darauf eine Trennung der Dipeptide von den höheren Polypeptiden beruht. Im Zusammenhang damit steht die Bildung der Diketopiperazine durch Anhydrisierung der Dipeptide selbst, die in manchen Fällen recht glatt beim Schmelzen erfolgt[7].

---

[1]) E. Fischer und U. Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 4173 [1905]. (*S. 438.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 469 [1906]. (*S. 566.*)

[3]) E. Fischer und E. Königs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4601 [1904]. (*S. 420.*)

[4]) E. Fischer und E. Otto, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2112 [1903]. (*S. 321.*)

[5]) E. Fischer und E. Königs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4589 [1904]. (*S. 406 ff.*)

[6]) E. Fischer und E. Fourneau, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2873 [1901]. (*S. 285.*)

[7]) Ann. d. Chem. **340**, 126 ff. [1905]. (*S. 465.*)

Eine recht eigenartige Entstehung von Diketopiperazinen wurde bei der α-Amino-γ-oxy-valeriansäure beobachtet[1]), denn ihr öliges Lacton verwandelt sich schon bei gewöhnlicher Temperatur durch Umlagerung und Polymerisation in das feste Piperazinderivat. Wahrscheinlich wird man den gleichen Vorgang bei anderen α-Amino-γ-oxysäuren wiederfinden.

Endlich erwähne ich noch eine kompliziertere Bildungsweise der Dipeptide. Bei der Darstellung des Diglycyl-glycins und des Triglycylglycins aus den entsprechenden Chloracetylkörpern wurde als Nebenprodukt eine kleine Menge Glycinanhydrid beobachtet[2]). Hier muß also in geringem Maße eine hydrolytische Sprengung der Glycinkette stattfinden.

Bildung der Dipeptide aus den 2,5-Diketopiperazinen.

Die Reaktion wurde zuerst bei dem Glycinanhydrid beobachtet und führte, wie bereits mehrfach erwähnt, zur Entdeckung des ersten Dipeptids, des Glycyl-glycins. Der Vorgang entspricht der Gleichung:

$$NH\left\langle\begin{matrix}CH_2.CO\\CO.CH_2\end{matrix}\right\rangle NH + H_2O = NH_2CH_2CO.NHCH_2COOH$$ [3]).

Er wurde zuerst durch kurzes Erwärmen mit starker Salzsäure bewirkt[4]), wobei das Hydrochlorat des Dipeptids entsteht und beim starken Abkühlen kristallisiert. Verwendet man an Stelle der wässerigen Lösung alkoholische Salzsäure, so resultiert das Hydrochlorat des Glycyl-glycinesters. Bei den Homologen des Glycinanhydrids stößt die praktische Ausführung der Reaktion auf größere Schwierigkeiten. Bei dem Alaninanhydrid z. B. sind die Produkte der Aufspaltung mit Salzsäure sowohl in wässeriger wie in alkoholischer Lösung so schwer zu kristallisieren, daß ihre Isolierung bisher nicht gelang, und es bedurfte hier der Überführung des Alanyl-alaninesters in seine Carbäth-

---

[1]) E. Fischer und H. Leuchs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3798 [1902]. *(S. 260.)*

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2501 ff. [1904]. *(S. 351.)*

[3]) Bei den aromatischen Abkömmlingen des Diketopiperazins, z. B. dem Ditolylderivat $CH_3.C_6H_4.N\left\langle\begin{matrix}CH_2.CO\\CO.CH_2\end{matrix}\right\rangle N.C_6H_4.CH_3$, ist die gleiche Reaktion schon 1888 von P. W. Abenius und O. Widman (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1662 [1888]) beschrieben worden. Aber an ihre Übertragung auf die aliphatischen Verbindungen, bei denen allerdings nicht allein die äußeren Eigenschaften, sondern auch die Affinitätsverhältnisse wesentlich anders sind, hat niemand gedacht.

[4]) E. Fischer und E. Fourneau, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2869 [1901]. *(S. 280.)*

oxylverbindung, um ein reines Präparat zu gewinnen[1]). Wieder andere Bedingungen waren nötig bei dem schwer löslichen Leucinanhydrid (Leucinimid). Hier gelang die Verwandlung in Leucyl-leucin am besten durch $^1/_2$-stündiges Erhitzen mit einer bei 0° gesättigten, wässerigen Bromwasserstoffsäure.

Bequemer ist die Aufspaltung der Diketopiperazine durch verdünntes Alkali[2]). Bei Anwendung von Normal-Natronlauge vollzieht sich die Verwandlung des Glycinanhydrids in das Dipeptid bei gewöhnlicher Temperatur schon in 15—20 Minuten, und die Isolierung des Dipeptids bietet gar keine Schwierigkeiten, besonders wenn man das Alkali nicht durch Salzsäure, sondern durch Jodwasserstoff oder Essigsäure abstumpft, weil die hierdurch entstehenden Natriumverbindungen in Alkohol leicht löslich sind und sich deshalb bequem vom Glycyl-glycin trennen lassen. Nach diesem Verfahren wurde auch ohne Schwierigkeit das bis dahin unbekannte racemische Alanyl-alanin gewonnen[3]).

Langsamer erfolgt der Angriff des Alkalis bei den kohlenstoffreicheren Diketopiperazinen; denn bei dem Anhydrid der α-Aminobuttersäure ist bei gewöhnlicher Temperatur schon tagelanges Schütteln notwendig[4]). Ähnliches wurde beim Anhydrid des Histidins beobachtet[5]). Allerdings geht die Aufspaltung bei höherer Temperatur rascher von statten, aber dabei entsteht dann auch die Gefahr, daß die Hydrolyse weiter bis zur Bildung von Aminosäuren fortschreitet. Bei dem Leucinanhydrid[6]) ist die Schwierigkeit noch größer, so daß die Reaktion hier noch nicht durchgeführt werden konnte.

Eine besondere Betrachtung verdienen die unsymmetrisch substituierten Diketopiperazine von der Formel:

$$NH\left\langle\begin{matrix}CO\text{——}CH_2\\ \\CH(R).CO\end{matrix}\right\rangle NH \quad \text{oder} \quad NH\left\langle\begin{matrix}CO\text{——}CH(R^1)\\ \\CH(R).CO\end{matrix}\right\rangle NH\ .$$

Sie entsprechen zwei verschiedenen Dipeptiden, aus denen sie einerseits entstehen, und in die sie andererseits durch Aufspaltung

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1103 [1902]. (*S. 299.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 607 [1905]. (*S. 424.*)

[3]) E. Fischer und K. Kautzsch, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2375 [1905]. (*S. 527.*)

[4]) Nach Versuchen von Dr. K. Raske.

[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 4185 [1905]. (*S. 451.*)

[6]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 609 [1905]. (*S. 426.*)

zurückgehen können. Dieser Fall wurde experimentell geprüft bei dem Leucyl-glycin-anhydrid,

$$NH\langle\begin{matrix} CO . CH.C_4H_9 \\ CH_2.CO \end{matrix}\rangle NH \quad .$$

Es entsteht sowohl aus dem Leucyl-glycin wie aus dem Glycyl-leucin durch Abspaltung von Wasser[1]) und liefert bei der Aufspaltung mit Alkali wieder beide Dipeptide[2]), allerdings in ungleicher Menge.

Zu erwähnen ist endlich die ziemlich weitgehende Racemisierung die beim Aufspalten des *d*-Alanin-anhydrids mit Alkali eintritt[3]).

Synthese der Polypeptide mittels der Ester.

Während die Ester der einfachen α-Aminosäuren unter Abgabe von Alkohol so leicht in Diketopiperazine übergehen, führt die Reaktion bei der Diamino-propionsäure nur bis zum Ester des Dipeptids. Der Grund dafür ist vielleicht der, daß die Kupplung hier an der in β-Stellung befindlichen Aminogruppe erfolgt und dadurch die Bildung eines Piperazinringes unmöglich wird. In der Tat verhält sich das Isoserin ebenso, während der Methylester des Serins, das eine α-Aminosäure ist, unter den gleichen Bedingungen ein Diketopiperazin liefert[4]).

Die große Neigung der Ester zur Abspaltung von Alkohol ist auch noch bei den höheren Polypeptiden vorhanden. Curtius hat sie zuerst für den Äthylester des Triglycyl-glycins[5]) erwähnt, und ich habe sie bald nachher bei dem Derivat des Diglycyl-glycins beobachtet[6]). Viel glatter geht nach meiner Erfahrung der Vorgang bei den Methylestern. So konnte ich zeigen, daß der Methylester des Diglycyl-glycins bei 100° sehr rasch nach der Gleichung

$$2\,NH_2CH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO_2CH_3$$
$$= CH_4O + NH_2CH_2CO.(NHCH_2CO)_4.NHCH_2CO_2CH_3$$

in den Methylester des Hexapeptids übergeht, aus dem das Hexapeptid durch Verseifung leicht zu erhalten ist[7]). Voraussichtlich wird dieses Verfahren beim Aufbau komplizierterer Systeme noch recht gute Dienste leisten.

---

1) Ann. d. Chem. **340**, 127 [1905]. (*S. 466.*)

2) Nach Versuchen von Herrn Schrauth, die noch nicht publiziert sind.

3) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 469 [1906]. (*S. 566.*)

4) E. Fischer und U. Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 4174 [1905]. (*S. 439.*)

5) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1300 [1904].

6) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2501 [1904]. (*S. 352.*)

7) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 453 [1906]. (*S. 567.*)

Synthese der Polypeptide mittels der Halogenacyl-Verbindungen.

Ebenso leicht wie die gewöhnlichen Säureradikale lassen sich die halogenhaltigen Acyle in die Aminosäuren einführen, und durch nachträgliche Behandlung der Produkte mit Ammoniak entstehen Dipeptide. Für das Glycyl-glycin wird der Vorgang durch folgende Gleichung veranschaulicht:

$$ClCH_2CO.NHCH_2COOH + 2\,NH_3$$
$$= NH_4Cl + NH_2CH_2CO.NHCH_2COOH.$$

Das Dipeptid läßt sich dann von neuem mit dem Halogenacyl verkuppeln, und abermalige Behandlung mit Ammoniak liefert jetzt das Diglycyl-glycin:

$$NH_2CH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH.$$

Die Synthese wurde bis zu dem Pentapeptid fortgeführt, aber die Grenze ihrer Leistungsfähigkeit ist damit sicher noch nicht erreicht. Zur Einführung des Halogenacyls in die Aminosäure oder das Polypeptid stehen zwei Methoden zur Verfügung: Einwirkung des Halogenacylchlorids auf die alkalische Lösung der Aminosäure bzw. des Polypeptids oder auf die Lösung ihrer Ester. Der erste Weg ist der bequemere und gibt in vielen Fällen ausgezeichnete Resultate. Bei einfacheren Halogenacylchloriden, wie Chloracetylchlorid oder Brompropionylbromid, die schon von Wasser sehr rasch zersetzt werden, muß die Operation bei sehr niederer Temperatur ausgeführt werden und liefert trotzdem in manchen Fällen keine gute Ausbeute.

Bei dem zweiten Verfahren, d. h. bei der Anwendung der Ester, verläuft die Reaktion in der Regel glatter, besonders in wasserfreien Lösungsmitteln wie Äther, Petroläther, Chloroform; aber sie hat den Nachteil, daß man 2 Mol. Ester auf 1 Mol. des Säurechlorids verwenden muß, da die Hälfte des Esters als Hydrochlorat der Reaktion entzogen wird. Der Übelstand fällt allerdings weg, wenn man in wässeriger Lösung in Gegenwart von Alkali oder Alkalicarbonat arbeitet, aber auch dann ist noch eine nachträgliche Verseifung des Esters erforderlich, die ebenfalls Verluste von wechselnder Größe durch Veränderung des halogenhaltigen Radicals mit sich bringen kann. Im allgemeinen wird man also die Ester nur dann benutzen, wenn die Reaktion in wässeriger Lösung schlecht verläuft, oder wenn das anzuwendende Halogenacylchlorid verhältnismäßig kostspielig ist.

Als Halogenacylchloride kamen selbstverständlich vorzugsweise die in Betracht, die den α-Aminosäuren und zwar den in der Natur vorkommenden entsprechen. Bisher wurden benutzt:

Chlor-(Brom)-acetylchlorid	zur	Einführung	des	Glycyl;
α-Brom-propionylchlorid (bromid)	,,	,,	,,	Alanyl;
aktives l-α-Brom-propionylchlorid	,,	,,	,,	aktiven Alanyl;
α-Brom-butyrylchlorid	,,	,,	,,	α-Aminobutyryl;
α-Brom-isocapronylchlorid	,,	,,	,,	Leucyl;
α-Brom-phenylacetylchlorid	,,	,,	,,	Phenylglycyl;
α-Brom-hydrozimmtsäurechlorid	,,	,,	,,	Phenylalanyl;
α,δ-Dibrom-valerylchlorid	,,	,,	,,	Prolyl.

Die Mehrzahl dieser Chloride mußte für die Zwecke der Synthese erst bereitet werden und für einige davon, wie das Brom-isocapronyl-[1]) und das Brom-hydrozimmtsäure-Chlorid[2]), fehlte auch noch die Synthese der zugehörigen Säuren.

Einer besonderen Erläuterung bedarf die Benutzung des α,δ-Dibromvalerylchlorids zur Bereitung von Prolylverbindungen. Die Wirkung des Ammoniaks führt hier nämlich nicht zur Substitution beider Halogene durch Amid, sondern es wird statt dessen der Ring des Pyrrolidins erzeugt.

Speziell studiert wurde der Vorgang bei dem α,δ-Dibromvalerylalanin, dessen Umwandlung in Prolyl-alanin[3]) durch folgende Gleichung wiedergegeben wird:

$$CH_2Br.CH_2.CH_2.CHBr.CO.NH.CH(CH_3).COOH + 3\,NH_3$$
$$= 2\,NH_4Br + \underbrace{CH_2.CH_2.CH_2.CH}_{NH}.CO.NH.CH(CH_3).COOH.$$

Mit der Halogenacyl-Methode sind die meisten bisher bekannten Polypeptide gewonnen worden. Die Zahl der Halogenacyle kann gewiß noch vergrößert werden, und ich habe die Hoffnung, daß man bei Verwendung von α,β-, α,γ- und α,ε-Dibromacylen auch das Radikal der Diamino- bzw. Oxyamino-Säuren einführen kann.

Als anderer Komponent sind außer den gewöhnlichen Aminosäuren auch die Oxyaminoverbindungen, wie Tyrosin[4]) und Isoserin[5]),

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2988 [1903] (*S. 332*); **37**, 2492 [1904]. (*S. 342.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3062 [1904]. (*S. 369.*)

[3]) E. Fischer und U. Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2842 [1904]. (*S. 363.*)

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2495 [1904]. (*S. 344.*)

[5]) E. Fischer und F. Kölker, Ann. d. Chem. **340**, 172 [1905]. (*S. 501.*)

oder Prolin[1]) und endlich kompliziertere Substanzen, wie Cystin[2]), bereits mit Erfolg benutzt worden.

In einem Falle hat bisher die Methode versagt. Das Halogensuccinyl nämlich kann in den Kombinationen mit Aminosäuren nicht in Asparagyl verwandelt werden, sondern liefert ausschließlich Fumaryldert; aber glücklicherweise kann in diesem besonderen Falle der Schaden durch ein Spezialverfahren ausgeglichen werden, denn diese Fumarylkörper addieren beim Erhitzen mit starkem, wässerigem Ammoniak die Base unter Bildung von Asparagyl-Verbindungen. Auf diese Weise wurden Asparagyl-di-alanin, $\begin{matrix} CH_2CO.NHCH(CH_3)COOH \\ NH_2.\dot{C}H_2CO.NHCH(CH_3)COOH \end{matrix}$, und Asparagyl-mono-glycin gewonnen[3]). Wahrscheinlich wird sich die letzte Reaktion auch auf Verbindungen von einfachen ungesättigten Acylen ausdehnen lassen; aber es besteht dann die Gefahr, daß die Aminogruppe nicht in die α-, sondern wie bei den ungesättigten Säuren in die β-Stellung eintritt.

Aufbau der Polypeptide durch Verlängerung der Kette am Carboxyl.

Daß man bei den Benzoylderivaten der Aminosäuren mit Hilfe der Ester und der Azide in dieser Richtung aufbauen kann, hat Curtius in weitgehender Weise gezeigt. Ich selbst habe für die Carbäthoxyl-Verbindungen eine ähnliche Methode gefunden, bei der die Chloride, die man durch Behandlung mit Thionylchlorid gewinnt, in Anwendung kommen. Beide Verfahren sind in der historischen Einleitung ausführlich besprochen.

Für die Synthese der Polypeptide kommen sie nicht in Betracht, da es bisher kein Mittel gibt, das Benzoyl oder das Carbäthoxyl ohne Schädigung des ganzen Systems abzuspalten.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, habe ich die gleiche Reaktion auf die Halogenacyl-Verbindungen ausgedehnt und dadurch eine sehr brauchbare Methode für die Darstellung von Polypeptiden gewonnen.

Für die Chlorierung des Carboxyls hat sich aber das Thionylchlorid in den meisten Fällen nicht bewährt. Ich mußte vielmehr auf

---

[1]) E. Fischer und E. Abderhalden, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3071 [1904]. (*S. 379.*)

[2]) E. Fischer und U. Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4575 [1904]. (*S. 395.*)

[3]) E. Fischer und E. Königs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4585 [1904]. (*S. 402.*)

das Phosphorpentachlorid zurückgreifen, kam aber damit erst zum Ziel, als gleichzeitig Acetylchlorid zur Lösung verwendet wurde.

Der erste erfolgreiche Versuch betraf das α-Bromisocapronyl-glycin[1]). Bei der Behandlung mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid liefert es ein Produkt, das zwar nicht analysiert werden konnte, das aber nach seinem ganzen Verhalten sehr wahrscheinlich die Struktur $C_4H_9.CHBr.CO.NH.CH_2.COCl$ hat. Dieses läßt sich nun sehr leicht mit den Estern von Aminosäuren oder Polypeptiden verkuppeln. So entstehen z. B. mit Glycin-äthylester und Glycyl-glycinester[2]) folgende beide Verbindungen:

$$C_4H_9.CHBr.CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO_2C_2H_5,$$
$$C_4H_9.CHBr.CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO_2C_2H_5.$$

Durch Verseifung und nachträgliche Behandlung mit Ammoniak wird die erste in das Leucyl-glycyl-glycin und die zweite in das Leucyl-diglycyl-glycin verwandelt. Daß das Verfahren auch noch bei komplizierteren Systemen verwendbar ist, beweist das Verhalten des α-Brom-isocapronyl-diglycyl-glycins[3]).

Die Darstellung des Chlorids gelingt hier sogar besonders leicht, und dieses läßt sich nicht allein mit Glykocollester, sondern ebenso leicht mit Glykocoll selbst oder sogar mit Polypeptiden, wie Glycyl-glycin oder Diglycyl-glycin, in alkalischer Lösung kuppeln.

Aus den so resultierenden Brom-Verbindungen konnten dann durch Ammoniak die Polypeptide:

Leucyl-tetraglycyl-glycin und Leucyl-pentaglycyl-glycin

gewonnen werden. Diese Methode ist gewiß noch eines weiteren Ausbaus fähig. Sie hat nur den Nachteil, daß manche Chloride, besonders die einfacher zusammengesetzten, in Acetylchlorid löslich sind und beim Verdampfen der Lösung eine teilweise Zersetzung erleiden.

Dieser Übelstand fällt weg bei der Übertragung der Reaktion auf die Aminosäuren selbst. Sie werden dadurch, wie oben ausführlich dargelegt ist, in die Hydrochlorate der Aminosäurechloride von der allgemeinen Formel $\begin{array}{c}R.CH.COCl\\ \cdot\\ NH_3Cl\end{array}$ verwandelt, die in der Regel in Acetylchlorid schwer löslich und deshalb leicht zu isolieren sind[4]).

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3070 [1904]. (*S. 377.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 610 [1905]. (*S. 427.*)
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 453 [1906]. (*S. 550.*)
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 606 und 2914 [1905]. (*S. 423 u. 538.*)

Werden diese Chlorverbindungen dann bei gewöhnlicher Temperatur mit den Estern der Aminosäuren zusammengebracht, so entstehen meist in guter Ausbeute die Ester der entsprechenden Dipeptide, aus denen man durch Verseifung die Dipeptide selbst gewinnen kann.

Das Chlorierungsverfahren hat sich bei allen einfachen Monoaminosäuren bewährt. Besonders wichtig ist seine Brauchbarkeit bei den optisch-aktiven Aminosäuren, weil sie einen neuen Weg für die Synthese von optisch-aktiven Polypeptiden eröffnet[1]). Versagt hat leider das Verfahren bisher bei den Oxy-amino- und Diamino-Säuren, weil hier phosphorhaltige Produkte resultieren.

Dagegen scheint die Reaktion einer allgemeineren Anwendung fähig zu sein bei den Polypeptiden. So konnten das Leucyl-glycin und das Leucyl-diglycin in die entsprechenden Chlorderivate übergeführt werden, die durch Kombinationen mit Leucinester und Glycinester ein Tri- bzw. Tetra-peptid lieferten.

Voraussichtlich wird es gelingen, an Stelle der einfachen Aminosäureester auch die Polypeptidester oder an Stelle der Ester die alkalische Lösung der Aminosäuren und Polypeptide bei dieser Synthese zu verwerten.

Synthese von optisch-aktiven Polypeptiden.

Da alle in der Natur vorkommenden Proteïne, sowie ihre Spaltungsprodukte: Albumosen, Peptone usw. optisch-aktiv sind, so muß das vornehmste Ziel der Synthese selbstverständlich die Gewinnung von Polypeptiden sein, die nur die natürlichen optisch-aktiven Aminosäuren enthalten. Ich habe mich deshalb besonders bemüht, möglichst viele praktische Methoden für diesen Zweck aufzufinden.

Die ersten Erfolge wurden erzielt durch die Übertragung der Halogenacyl-Methode auf die aktiven Aminosäuren. Dahin gehört die Synthese des Glycyl-*l*-tyrosins[2]), des Glycyl-asparagins[3]) und des Diglycyl-cystins[4]). Komplizierter werden die Verhältnisse bei Anwendung von Halogenacylen mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom, wie α-Brom-propionylbromid oder α-Brom-isocapronylchlorid, denn ihre Kombination mit einer aktiven Aminosäure muß ein Gemisch von zwei isomeren optisch-aktiven Halogenverbindungen bzw. Dipeptiden liefern. In einzelnen Fällen, wie bei dem *d*- und *l*-Leucylasparagin lassen sich diese beiden Formen durch Kristallisation trennen, und man erhält dann

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2921 [1905] (*S. 545*); **39**, 453 [1906]. (*S. 562.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2495 [1904]. (*S. 344.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4587 [1904]. (*S. 405.*)

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4577 [1904]. (*S. 397.*)

einheitliche optisch-aktive Dipeptide[1]). Gewöhnlich aber sind die Löslichkeitsverhältnisse der stereoisomeren Körper so ähnlich, daß ihre Scheidung durch Umlösen nicht gelingt. Aus diesem Grunde ist die Einheitlichkeit mancher der früher beschriebenen aktiven Polypeptide, wie Leucyl-*l*-tyrosin[2]), Leucyl-asparaginsäure[3]), zweifelhaft.

Einen besonderen Fall bieten das Dialanyl- und Dileucyl-Cystin, denn hier ist auch die Möglichkeit vorhanden, daß ein einheitliches Molekül entsteht[4]), welches sowohl die *d*- wie die *l*-Form des Alanyls bzw. Leucyls enthält.

Eine zweite Methode beruht auf der Anwendung optisch-aktiver Halogenacyle. Mit Hilfe des linksdrehenden α-Brom-propionylchlorids wurde die Synthese des *l*-Alanyl-glycins[5]) ausgeführt. Leider aber sind die aktiven Halogenacylchloride bzw. die entsprechenden Halogenfettsäuren schwer zugänglich, und selbst in dem vorstehenden Falle enthielt das Dipeptid nicht das natürliche *d*-Alanin, sondern den optischen Antipoden.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, habe ich versucht, die racemischen Halogenacyl-aminosäuren, z. B. das α-Bromisocapronyl-glycin, durch Alkaloïde in die optisch-aktiven Komponenten zu spalten, aber bisher keinen rechten Erfolg gehabt.

Recht wertvoll scheint mir endlich für den Aufbau aktiver Polypeptide die zuvor schon erwähnte Verwendung der Chloride von aktiven Aminosäuren. Genauer geprüft ist sie bei dem *d*-Alanin, dessen Chlorid mit den Estern des Glykocolls und des *d*-Alanins kombiniert wurde, wobei einerseits das *d*-Alanyl-glycin und andererseits das *d*-Alanyl-*d*-alanin resultierte. Da das Verfahren aller Wahrscheinlichkeit nach auch für die aktiven Polypeptide angewandt werden kann, so wird es voraussichtlich für die Bereitung komplizierterer optisch-aktiver Formen noch eine große Rolle spielen.

Mit Hilfe der zuvor zusammengestellten Methoden sind bisher nahezu 70 Polypeptide der verschiedensten Zusammensetzung bereitet worden, die ich zur leichteren Übersicht in der folgenden Tabelle zusammenstelle. Bei jeder Verbindung ist die hauptsächlichste Literaturstelle mit denselben Abkürzungen wie in der ersten Tabelle (*vgl. S. 19*) zugefügt.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4591 [1904], (S. *409*) und nach weiteren, noch nicht publizierten Versuchen von Dr. E. Königs.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2498 [1904]. (*S. 348.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4593 [1904]. (*S. 410.*)

[4]) Fischer und Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4575 [1904]. (*S. 395.*)

[5]) Fischer und Warburg, Ann. d. Chem. **340**, 165 [1905]. (*S. 496.*)

Tabelle der Polypeptide.

Dipeptide.

Glycyl-glycin (B. **34**, 2870, *S. 282*).
Glycyl-*dl*-alanin (B. **37**, 2489, *S. 340*).
Glycyl-*d*-alanin (noch nicht publiziert).
dl-Alanyl-glycin (A. **340**, 130, *S. 469*), Fischer und Axhausen.
d-Alanyl-glycin (B. **38**, 2921, *S. 545*).
l-Alanyl-glycin (A. **340**, 165, S. *496*), Fischer und Warburg.
Alanyl-alanin (inakt.) (B. **38**, 2376, *S. 528*), Fischer und Kautzsch.
d-Alanyl-*d*-alanin (B. **39**, 465, *S. 562*).
α-Aminobutyryl-glycin (A. **340**, 182, *S. 509*) Fischer und Raske.
α-Aminobutyryl-α-Aminobuttersäure A } (A. **340**, 187, *S. 511/512*)
„ „ B } Fischer und Raske.
Glycyl-*dl*-leucin (A. **340**, 157, *S. 490*), Fischer und Warburg.
dl-Leucyl-glycin (A. **340**, 144, *S. 479*), Fischer und Brunner.
Alanyl-leucin A } (A. **340**, 154, 155, *S. 487*), Fischer und Warburg.
„ „ B }
Leucyl-alanin (A. **340**, 160, *S. 492*), Fischer und Warburg.
Leucyl-isoserin A } (A. **340**, 174, 175, *S. 502*), Fischer und Kölker.
„ „ B }
Leucyl-leucin (B. **35**, 1104, *S. 299* und **37**, 2491, *S. 343*).
Phenylglycyl-glycin (A. **340**, 192, *S. 517*) } Fischer und
Phenylglycyl-alanin A } (A. **340**, 197, *S. 520*) } Schmidlin.
„ „ B }
Glycyl-phenylalanin (B. **37**, 3313, *S. 392*) }
Alanyl-phenylalanin (ibid.) (*S. 391*) } Leuchs und Suzuki.
Leucyl-phenylalanin A } (B. **37**, 3308, }
„ „ B } *S. 386*) }
Phenylalanyl-glycin (B. **38**, 2919, *S. 543*).
Phenylalanyl-phenylalanin (B. **37**, 3068, *S. 376*).
Glycyl-*l*-tyrosin (B. **37**, 2495, *S. 346*).
Leucyl-*l*-tyrosin (B. **37**, 2498, *S. 348*).
Seryl-serin (B. **38**, 4195, *S. 461*) } Fischer und Suzuki.
Isoseryl-isoserin (B. **38**, 4193, *S. 459*) }
Glycyl-asparagin (B. **37**, 4587, *S. 405*) } Fischer und Königs.
Leucyl-asparagin (B. **37**, 4591, *S. 409*) }
Phenylglycyl-asparagin (A. **340**, 199, *S. 523*), Fischer u. Schmidlin.
Leucyl-asparaginsäure (B. **37**, 4593, *S. 410*) } Fischer und Königs.
Asparagyl-monoglycin (B. **37**, 4594, *S. 412*) }
dl-Prolyl-alanin (B. **37**, 2845, *S. 366*), Fischer und Suzuki.
Leucyl-prolin (inaktiv) (B. **37**, 3074, *S. 382*) { Fischer und Abderhalden.

Dipeptide der Diaminosäuren.

Diamino-propionsäure-Dipeptid (*S. 443*)
Lysyl-lysin (*S. 448*)
Histidyl-histidin (*S. 451*)
} (B. **38**, 4173) Fischer und Suzuki.

Tripeptide.

Diglycyl-glycin (B. **36**, 2983, *S. 327* und **37**, 2500, *S. 350*).
dl-Alanyl-glycyl-glycin (B. **36**, 2987, *S. 330*).
Dialanyl-alanin (B. **38**, 2384, *S. 536*), Fischer und Kautzsch.
dl-Leucyl-glycyl-glycin (B. **36**, 2990, *S. 333*).
Leucyl-alanyl-alanin A
„ „ „ B
} (B. **38**, 2381, *S. 533*), Fischer und Kautzsch.
Glycyl-leucyl-alanin (A. **340**, 164, *S. 495*) { Fischer und Warburg.
Alanyl-leucyl-glycin (A. **340**, 150, *S. 484*) { Fischer und Brunner.
Leucyl-alanyl-glycin A
„ „ „ B
} (A. **340**, 136, 137, *S. 471*), Fischer und Axhausen.
dl-Phenylalanyl-glycyl-glycin (B. **37**, 3066, *S. 373*).
Diglycyl-phenylalanin (B. **37**, 3315, *S. 393*)
Leucyl-glycyl-phenylalanin (B. **37**, 3314, *S. 393*)
Dileucyl-phenylalanin oder
Leucyl-α-leucylphenylalanin (B. **37**, 3311, *S. 389*)
} Leuchs und Suzuki.
Asparagyl-dialanin (B. **37**, 4597, *S. 415*), Fischer und Königs.

Tetrapeptide.

Triglycyl-glycin (B. **37**, 2501, *S. 352*).
dl-Leucyl-diglycyl-glycin (B. **38**, 611, *S. 429*).
Dileucyl-glycyl-glycin (B. **37**, 2506, *S. 356*).
Diglycyl-cystin (B. **37**, 4577, *S. 397*)
Dialanyl-cystin (B. **37**, 4579, *S. 399*)
Dileucyl-cystin (B. **37**, 4580, *S. 400*)
} Fischer und Suzuki.

Pentapeptide.

Tetraglycyl-glycin (B. **37**, 2507, *S. 358*).

Hexapeptide.

Pentaglycyl-glycin (B. **39**, 472, *S. 569*).
Leucyl-tetraglycyl-glycin (B. **39**, 460, *S. 557*).

Heptapeptide.

Leucyl-pentaglycyl-glycin (B. **39**, 461, *S. 558*).

Struktur der Polypeptide und Diketopiperazine.

Die Resultate der Synthese und alle bisher bekannten Metamorphosen der Polypeptide führen übereinstimmend zu dem Schlusse, daß in ihnen die Aminosäuren amidartig verkuppelt sind. Dies gilt auch für die Derivate der Oxyaminosäuren, z. B. die Leucyl-isoserine, bei denen die zweite Möglichkeit, nämlich eine esterartige Verkupplung der Komponenten, durch eine besondere Untersuchung ausgeschlossen werden konnte[1]). Trotz dieser Vereinfachung bleibt die Frage nach der Struktur und der Möglichkeit von isomeren Formen bei den Polypeptiden immer noch kompliziert genug; denn bei ihnen vereinigen sich die Streitpunkte, welche bezüglich der Struktur der Amide und der Aminosäuren bisher unerledigt geblieben sind. Wir haben also einerseits mit der Möglichkeit von Lactam- und Lactim-Formen und andererseits mit dem Gegensatz von freier Aminosäure und intramolekularem Salz zu rechnen. Für das Glycyl-glycin ergeben sich daraus folgende vier Formeln:

$$NH_2CH_2CO.NHCH_2COOH \qquad NH_2CH_2C(OH):NCH_2COOH$$

$$\underbrace{NH_3CH_2CO.NHCH_2COO} \qquad \underbrace{NH_3CH_2C(OH):NCH_2COO}\ .$$

Da es nach den bisher vorliegenden Beobachtungen unmöglich ist, eine Auswahl zwischen ihnen zu treffen, so habe ich der Einfachheit halber nur die erste Formel gebraucht. Ich halte es aber keineswegs für überflüssig, bei einem gründlicheren Studium der Polypeptide auch die übrigen Formen, deren Zahl natürlich mit der Größe des Moleküls sich vermehrt, ins Auge zu fassen. Schon jetzt habe ich bei einigen Polypeptiden Beobachtungen gemacht, die auf verschiedene Zustände hinzudeuten scheinen. So ist das Leucyl-diglycyl-glycin im amorphen Zustand in Alkohol leicht löslich; erwärmt man aber die alkoholische Flüssigkeit auf dem Wasserbade, so beginnt nach einiger Zeit die Abscheidung des kristallinischen Tetrapeptids, das nun in Alkohol sehr schwer löslich ist[2]).

Eine besondere Art von Isomerie, deren Ursache bisher auch noch nicht aufgeklärt ist, hat sich bei den Carbäthoxyl-Verbindungen der Polypeptide gezeigt. Die Erscheinung wurde zuerst beobachtet bei dem Carbäthoxyl-glycyl-glycinester; die daraus durch Verseifung mit Alkali entstehende Glycyl-glycin-carbonsäure, $HO_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$, gibt nämlich bei der Behandlung mit alkoholischer Salzsäure einen ebenfalls neutralen Ester, der mit der ursprünglichen Ver-

[1]) Ann. d. Chem. **340**, 177 [1905]. (*S. 505.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 611 [1905]. (*S. 429.*)

bindung isomer ist. Ich habe die Ester vorläufig als α- und β-Verbindung unterschieden und mußte die Feststellung ihrer Struktur weiteren Versuchen überlassen.

Die gleiche Art der Isomerie wurde bei dem Carbäthoxyl-diglycyl-glycinester und endlich auch bei den entsprechenden Doppelamiden beobachtet[1]).

Eine weitere Komplikation erfährt die Frage nach der Struktur der Polypeptide, wenn sie Amino-dicarbonsäure oder Diaminosäure enthalten. So mußte für das Asparagyl-monoglycin die Wahl zwischen den beiden Formeln

$$\begin{array}{lcl} CO.NH.CH_2.COOH & & COOH \\ \dot{C}H.NH_2 & \text{oder} & \dot{C}H.NH_2 \\ \dot{C}H_2.COOH & & \dot{C}H_2.CO.NH.CH_2.COOH \end{array}$$

offen bleiben[2]). Ebensowenig konnte für das Dipeptid der Diaminopropionsäure eine Entscheidung zwischen den Formeln

$$NH_2.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CH(NH_2).COOH$$

$$\begin{array}{l} NH_2.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH.COOH \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \dot{C}H_2.NH_2 \end{array}$$

getroffen werden[3]).

In nächster Beziehung zu den Dipeptiden stehen die Diketopiperazine. Auch bei ihnen hat man außer der üblichen Ketoform die Enolform zu berücksichtigen. Für die einfachste Verbindung der Klasse, das Glycinanhydrid, sind also drei Möglichkeiten gegeben:

$$NH\langle\begin{smallmatrix} CO.CH_2 \\ CH_2.CO \end{smallmatrix}\rangle NH \quad N\langle\!\!\langle\begin{smallmatrix} C(OH).CH_2 \\ CH_2.C(OH) \end{smallmatrix}\rangle\!\!\rangle N \quad N\langle\!\!\langle\begin{smallmatrix} C(OH).CH_2 \\ CH_2 — CO \end{smallmatrix}\rangle NH\,.$$

Bei der Aufspaltung des Alaninanhydrids durch Alkali wurde in der Tat die vorübergehende Bildung einer Alkaliverbindung beobachtet, die allerdings nicht analysiert worden ist, die man aber mit einem ziemlich großen Grad von Wahrscheinlichkeit als das Derivat einer Enolform betrachten darf[4]).

Konfiguration der Polypeptide[5]).

Mit Ausnahme des Glykocolls enthalten alle α-Aminosäuren, um die es sich bei den vorliegenden Synthesen vorzugsweise handelt, ein asymmetrisches Kohlenstoffatom. Bei den Polypeptiden berechnet sich

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2096 [1903]. (*S. 304.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4594 [1904]. (*S. 412.*)
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 4173 [1905]. (*S. 438.*)
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 609 (*S. 426*) und 2376 [1905]. (*S. 528.*)
[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2486 [1904]. (*S. 337.*)

also die Zahl der selbständigen optischen Isomeren nach der bekannten van 't Hoffschen Formel 2^n. Z. B. ein Dipeptid von der allgemeinen Formel:

$$NH_2.\underset{*}{C}HR.CO.NH.\underset{*}{C}HR.COOH$$

muß wegen der beiden durch Sternchen markierten, asymmetrischen Kohlenstoffatome in vier aktiven Formen existieren, von denen je zwei eine racemische Verbindung bilden können. Bei Benutzung von racemischem Rohmaterial ist also a priori die Bildung von zwei isomeren inaktiven Substanzen zu erwarten, und diese müssen schon auftreten bei den halogenhaltigen Zwischenprodukten:

$$Br.\underset{*}{C}HR.CO.NH.\underset{*}{C}HR.CO_2H\,.$$

Derselbe Schluß gilt natürlich auch für die Umwandlung eines Dipeptids in Tripeptid, mit anderen Worten, für die Ankupplung jeder weiteren Aminosäure mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom. Diese Isomerie ist zuerst bei dem Leucyl-phenylalanin[1]) beschrieben worden. Dazu sind später viele neue Beispiele gekommen: Leucyl-alanyl-glycin, Alanyl-leucin, α-Aminobutyryl-α-aminobuttersäure, Phenylglycyl-alanin, Leucyl-isoserin[2]), Leucyl-alanyl-alanin[3]), und es verdient hervorgehoben zu werden, daß in fünf Fällen die Trennung der Isomeren schon bei den halogenhaltigen Zwischenprodukten gelungen ist.

Die bisherigen Betrachtungen sind selbstverständliche Konsequenzen der Theorie des asymmetrischen Kohlenstoffatoms, speziell angewandt auf die Bildung der Polypeptide, und ich hatte deshalb keinen Grund, auf ähnliche Beobachtungen bei der Bildung der gewöhnlichen Amide hinzuweisen. Das ist bald nach meiner Publikation durch E. Mohr[4]) geschehen, der bei der Darstellung der α-Phenyl-äthylamide der Benzyl-äthyl-essigsäure ebenfalls zwei Isomere erhielt. Wie in seiner zweiten Abhandlung erwähnt ist, hatten aber schon drei Jahre früher Kipping und Hall ähnliche Resultate bei den Hydrindamiden der Phenylchloressigsäure erhalten[5]).

Der Aufbau der Polypeptide hat jedoch ein viel reicheres Material für die Beleuchtung solcher Reaktionen gegeben, und ich konnte deshalb die Aufmerksamkeit auf einen anderen theoretisch recht wich-

---

[1]) Leuchs und Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3306 [1904]. (*S. 384.*)

[2]) Ann. d. Chem. **340**, 124 [1905]. (*S. 464.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2375 [1905]. (*S. 527.*)

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2702, 3470 [1904], und Journ. f. prakt. Chem. [2] **71**, 305 [1905].

[5]) Journ. chem. Soc. **79**, 445 [1901].

tigen Punkt lenken, d. h. auf das Mengenverhältnis, in welchem die beiden möglichen Isomeren praktisch enstehen. Da häufig nur eine einzige Form isoliert werden konnte, so muß man annehmen, daß sie unter der Bedingung der Synthese die begünstigte ist und darum, wenn auch nicht ausschließlich, so doch in überwiegender Menge entsteht. Theoretisch läßt sich das durch folgende Betrachtung erklären[1]). Wenn inaktives Chlorid und inaktive Aminosäure in Lösung zusammentreffen, so spielt sich der Vorgang der Vereinigung zwischen den vier aktiven Molekülen *d* und *l* einerseits und d^1 und l^1 andererseits ab. Bekanntlich übt aber die sterische Isomerie einen keineswegs untergeordneten Einfluß auf die Geschwindigkeit der Reaktion aus. Am deutlichsten zeigt sich das bei der Wirkung der Fermente, wie ich an zahlreichen Beispielen nachweisen konnte[2]). Aber auch bei einfacheren Molekülen zeigt sich der gleiche Unterschied, wenn auch in viel schwächerem Maße, wie von Marckwald und Mc Kenzie[3]) nachgewiesen wurde. Man kann sich deshalb auch vorstellen, daß die Reaktionen zwischen beiden Paaren von Molekülen mit ungleicher Geschwindigkeit verlaufen, und daß deshalb von den beiden Racemkörpern [dd^1, ll^1] und [dl^1, ld^1] das eine Paar leichter und deshalb in größerer Menge als das andere entsteht. Dieser Schluß ist durch die Erfahrung bei der Synthese der Polypeptide vielfach bestätigt worden, denn wo die beiden Isomeren beobachtet wurden, da war in der Regel ihr Mengenverhältnis recht ungleich. In dem Fall, wo nur ein Produkt isoliert werden konnte, ist die Entscheidung über seine Einheitlichkeit viel schwieriger, da die Isomeren auch so ähnlich sein können, daß sie hartnäckig Mischkristalle bilden. Ich verweise in der Beziehung auf das Bromisocapronyl-phenylalanin[4]) und das Bromisocapronyl-isoserin[5]), die beide durch die Umwandlung in je zwei Dipeptide als Gemische erkannt wurden.

Eine besondere Besprechung erfordert noch der Aufbau der optisch-aktiven Polypeptide. Sind beide Komponenten einheitlich aktive Stoffe, so kann natürlich nur ein Produkt resultieren; z. B. das Alanyl-alanin aus *d*-Alanylchlorid und *d*-Alaninester muß ein einheitliches optisch-aktives Dipeptid sein, das bei der Hydrolyse nur *d*-Alanin liefern kann. Anders liegen die Verhältnisse, wenn der eine der Komponenten aktiv und der andere racemisch ist. Dann ist die Entstehung

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2487 [1904]. (*S. 338.*)

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 60 [1898].

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2130 [1899].

[4]) Leuchs und Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3306 [1904]. (*S. 384.*)

[5]) Ann. d. Chem. **340**, 172 [1905]. (*S. 501 ff.*)

von zwei optisch-aktiven Substanzen zu erwarten, die aber keine optischen Antipoden sind. Dahin gehören die zahlreichen Kombinationen des aktiven Tyrosins, Asparagins und der Asparaginsäure mit Alanyl, Leucyl, Phenylglycyl. Da die Isomeren hier keine optischen Antipoden sind, so ist die Möglichkeit vorhanden, sie durch bloße Kristallisation zu trennen. Das gelang in der Tat bei dem Bromisocapronyl-asparagin und führte dann zur Gewinnung der beiden einheitlichen Leucyl-asparagine. In den meisten Fällen ist aber bisher diese Trennung nicht durchgeführt und scheint auch nicht ganz leicht zu sein, weil die Isomeren wegen ihrer großen Ähnlichkeit offenbar Mischkristalle bilden, auf die man den von mir[1]) zuerst gebrauchten Ausdruck „partielle Racemie" anwenden kann, und die überall dort anzunehmen sind, wo ein Racemkörper in Kombination mit dem aktiven Rest durch Kristallisation nicht in die beiden isomeren Formen getrennt werden kann[2]).

Einen eigenartigen Fall, der eine besondere Betrachtung erfordert, bieten die Derivate des Cystins. Diese Aminosäure gleicht, wie ein Blick auf die Strukturformel zeigt

$$COOH.\underset{*}{C}H(NH_2).CH_2.S.S.CH_2.\underset{*}{C}H(NH_2).COOH$$

in stereochemischer Beziehung der aktiven Weinsäure, denn sie besteht aus zwei gleichen Hälften mit je einem, durch Sternchen markierten, asymmetrischen Kohlenstoffatom, und es ist deshalb gleichgültig, an welcher Aminogruppe Substitution eintritt. „Kombiniert man nun Cystin mit zwei Molekülen eines racemischen Säurechlorids, wie α-Brompropionylchlorid, so können drei isomere, optisch-aktive Produkte entstehen. Werden die beiden Stereoisomeren des Säurechlorides mit *d* und *l* bezeichnet, so hat man für das Dibrompropionyl-cystin die drei Formen *dd*-, *ll*-, *dl*-Dibrompropionyl-cystin. In welchem Mengenverhältnis diese drei Produkte gebildet werden, läßt sich theoretisch nicht voraussagen; soviel kann man aber nach den bisherigen Erfahrungen sagen, daß die beiden Kombinationen *dd* und *ll* wahrscheinlich annähernd in gleicher Quantität resultieren werden, während die Kombination *dl* unabhängig von den anderen ist und deshalb auch das einzige Produkt der Reaktion sein kann[3])."

Von den drei bisher bekannten Polypeptiden des Cystins ist nun das Dialanyl-Derivat am schönsten und deshalb am genauesten untersucht. Das Dibrompropionyl-cystin, aus dem es gewonnen wird, ent-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **27**, 3225 [1894].

[2]) Vgl. Ladenburg, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **31**, 524 und 937 [1898].

[3]) Fischer und Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4576 [1904]. (*S. 396.*)

steht in einer Ausbeute von 71% und macht äußerlich den Eindruck einer einheitlichen Substanz. Sollte die weitere Untersuchung seine Homogenität bestätigen, so könnte man aus der Ausbeute und den vorangegangenen Betrachtungen den Schluß ziehen, daß es die *dl*-Verbindung sein muß.

Für die Bezeichnung der optisch-aktiven Polypeptide werde ich die schon eingebürgerten sterischen Namen der aktiven Aminosäuren benutzen. Als Beispiele wähle ich die beiden Leucylderivate des Asparagins; sie erhalten die Namen *l*-Leucyl-*l*-asparagin und *d*-Leucyl-*l*-asparagin. Nur das erste ist ein Derivat der in der Natur vorkommenden beiden Aminosäuren, des *l*-Leucins und *l*-Asparagins. Ebenso einfach und unzweideutig lassen sich die Racemformen der Polypeptide, die nur ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthalten, bezeichnen; z. B. sind

dl-Leucyl-glycin, Glycyl-*dl*-leucin

die beiden isomeren inaktiven Dipeptide.

Komplizierter wird diese Art der Bezeichnung bei Racemformen mit mehreren asymmetrischen Kohlenstoffatomen. Als Beispiel wähle ich das Alanyl-leucin. Von ihm haben wir folgende vier optisch-aktive Formen zu unterscheiden, die zwei durch die Klammern angedeuteten Antipodenpaare bilden

d-Alanyl-*d*-leucin }
l-Alanyl-*l*-leucin } I.

d-Alanyl-*l* leucin }
l-Alanyl-*d*-leucin } II.

Will man daraus abgekürzte Namen für die Racemformen ableiten, so ergeben sich die Ausdrücke *dl*-Alanyl-*dl*-leucin, *dl*-Alanyl-*ld*-leucin.

Diese Nomenklatur ist selbstverständlich erst dann anwendbar, wenn die Konfiguration der Polypeptide festgestellt ist. So lange das nicht zutrifft, ist es richtiger, die Unterscheidung der Isomeren durch die nichtssagenden Buchstaben A und B, die dem Namen angehängt werden, zu bewirken.

Als Regel habe ich den Buchstaben A den schwerer löslichen Stoffen beigelegt. Die Feststellung der Konfiguration von solchen Racemformen kann selbstverständlich am sichersten durch die Synthese der optisch-aktiven Formen und ihre Vereinigung zu Racemverbindungen geschehen, aber das Verfahren ist recht mühsam und wurde deshalb noch niemals angewandt.

Ein bequemerer Weg ist die Hydrolyse des Polypeptids durch Pankreassaft, die asymmetrisch stattfindet und nach allen bisherigen Beobachtungen nur die in den natürlichen Proteïnen vorkommenden

aktiven Aminosäuren liefert. Da von den beiden obenerwähnten Alanyl-leucinen nur die Verbindung A hydrolysiert wird, so kann man mit einiger Wahrscheinlichkeit schließen, daß sie mit der obigen Form II identisch ist, weil in ihr die aus den beiden natürlichen Aminosäuren bestehende Kombination *d*-Alanyl-*l*-leucin enthalten ist[1]).

Konfiguration der 2,5-Diketopiperazine.

Die Stereochemie dieser ringförmigen Gebilde ist im wesentlichen die gleiche wie diejenige der offenen Ketten, d. h. die Zahl der optischen Isomeren berechnet sich auch hier nach der Zahl der asymmetrischen Kohlenstoffatome, die aber bei den Derivaten der gewöhnlichen Aminosäuren nur 2 betragen kann. Das Anhydrid des obenerwähnten Alanyl-leucins wird also in 4 optisch-aktiven und 2 Racemformen existieren, die man sich aus den 4 aktiven Dipeptiden durch Ringschluß entstanden denken kann.

Bekannt ist davon nur eine racemische Form, die aus dem Leucyl-alanin durch Schmelzen entsteht[2]). Ob dieses Präparat ganz einheitlich war, erscheint mir allerdings nach den neueren Erfahrungen etwas zweifelhaft, da in anderen Fällen bei der hohen Schmelztemperatur sterische Umlagerungen beobachtet wurden.

Etwas anders liegen die Verhältnisse bei den Diketopiperazinen, die aus zwei Molekülen derselben Aminosäure gebildet sind, also zwei gleiche Substituenten enthalten. Für sie sieht die Theorie nur 4 Formen voraus: nämlich 2 optisch-aktive Antipoden nebst dem entsprechenden Racemkörper und eine inaktive, nicht spaltbare Mesoform, in welcher die Substituenten *trans*-Stellung haben. Die bisherigen Beobachtungen stehen mit dieser Schlußfolgerung ganz in Einklang.

Aus dem *d*-Alanyl-*d*-alanin wurde mit dem Umweg über den Ester das stark aktive *d*-Alaninanhydrid gewonnen, das die beiden Methyle in *cis*-Stellung enthalten muß[3]). Dieselbe Verbindung, nur etwas weniger rein, entsteht aus dem Äthyl- oder besser Methyl-Ester des *d*-Alanins durch längeres Erhitzen auf 100°. Bei der umgekehrten Aufspaltung des *d*-Alaninanhydrids zum aktiven Dipeptid durch verdünntes Alkali bei gewöhnlicher Temperatur wird aber fast die Hälfte racemisiert.

Noch vor der Auffindung des aktiven Alaninanhydrids ist bei einem komplizierteren Diketopiperazin, dem aus Asparaginsäure-äthyl-

---

[1]) Fischer und Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 54 [1905]. (*S. 597.*)

[2]) Fischer und Warburg, Ann. d. Chem. **340**, 163 [1905]. (*S. 494.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 453 [1906]. (*S. 551.*)

ester durch Wärme entstehenden 2,5-Diketopiperazin-3,6-diessigsäurediäthylester optische Aktivität beobachtet worden[1]).

Einen dritten Fall dieser Art bietet das aktive Glycin-*d*-alaninanhydrid, das einerseits von Abderhalden und mir aus Seide[2]) erhalten wurde und andererseits nach Versuchen von Hrn. Arnold Schulze aus Glycyl-*d*-alanin entsteht.

Eigenschaften der Polypeptide.

Ein Vergleich der bisher gewonnenen Körper in bezug auf physikalische Eigenschaften ergibt manche Ähnlichkeit, aber auch viele Unterschiede, deren Beachtung für die weitere experimentelle Behandlung der Klasse nützlich sein kann.

In Wasser sind die meisten Glieder der Gruppe leicht löslich. Um so mehr Beachtung verdienen die Ausnahmen; dahin gehören von den Dipeptiden: *dl*-Leucyl-glycin, Leucyl-alanin und Leucyl-leucin, ferner Phenylalanyl-glycin, Phenylalanyl-phenylalanin und die beiden Leucyl-phenylalanine, von Tripeptiden: Leucyl-alanyl-alanin A, Phenylalanyl-glycyl-glycin und Leucyl-glycyl-phenylalanin; von Tertapeptiden: Dileucyl-glycyl-glycin und endlich das Penta- und Hexapeptid des Glykocolls, die im Gegensatz zu den anderen Glycylderivaten selbst in heißem Wasser sehr schwer löslich sind.

Hervorzuheben ist die Beobachtung, daß die Polypeptide von manchen schwer löslichen Aminosäuren in Wasser spielend leicht löslich sind, wie das Glycyl- und Leucyl-tyrosin, daß ferner die gemischten Polypeptide in der Regel leichter löslich sind, als die aus gleichartigen Aminosäuren zusammengesetzten Formen[3]).

Von absolutem Alkohol werden die meisten künstlichen Polypeptide fast gar nicht aufgenommen. Eine Ausnahme bildet das Leucyl-prolin, das in Alkohol und sogar in Essigester ziemlich leicht löslich ist.

Die in Wasser schwer löslichen Polypeptide werden sowohl von Mineralsäuren, wie von Alkalien leicht aufgenommen, weil sie damit Salze bilden. Viel geringer ist die Löslichkeit in Essigsäure. Ein gutes Lösungsmittel ist in vielen Fällen auch Alkohol unter Zusatz von wenig wässerigem Ammoniak; beim Wegkochen des letzteren fällt dann in der Regel das Polypeptid aus.

---

[1]) Fischer und Königs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4601 [1904]. (*S. 419.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 752 [1906]. (*S. 624.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 473 [1906]. (*S. 570.*)

Einzelne Polypeptide, wie das Leucyl-diglycyl-glycin, sind im amorphen Zustand in Alkohol löslich, werden aber, zumal in der Wärme, in den unlöslichen kristallinischen Zustand übergeführt.

Die meisten Polypeptide schmelzen erst über 200° unter gleichzeitiger Zersetzung (Gasentwickelung und meistens auch Dunkelfärbung). Bei einigen, besonders den reinen Glycinderivaten, erfolgt die Zersetzung ohne Schmelzung. Einen besonders niedrigen Schmp., 116—119°, hat das Leucyl-prolin, das auch in manchen anderen Eigenschaften eine Sonderstellung einnimmt.

Beim Schmelzen gehen die meisten Dipeptide teilweise oder vollständig in die zugehörigen Diketopiperazine über. Bei den übrigen Polypeptiden ist die Veränderung in der Hitze noch wenig untersucht.

Im Gegensatz zu den α-Aminosäuren schmecken die Polypeptide nicht süß, sondern schwach bitter oder schwach fade; ziemlich stark bitter ist das Leucyl-prolin. Bei isomeren Polypeptiden zeigt sich manchmal eine sehr deutliche Geschmacksdifferenz; so ist das Leucyl-alanin geschmacklos, während die beiden isomeren Alanyl-leucine bitter schmecken. Am Geschmack kann man deshalb in vielen Fällen die Anwesenheit der süßen α-Aminosäuren neben den Polypeptiden erkennen. Es verdient bemerkt zu werden, daß auch die natürlichen Peptone einen bitteren Geschmack haben.

Im Gegensatz zu den Aminosäuren haben die aktiven Polypeptide in der Regel ein recht starkes Drehungsvermögen. Ich verweise in dieser Beziehung auf die aktiven Alanyl-glycine, das *d*-Alanyl-*d*-alanin und die beiden Leucyl-asparagine. Indessen ist das Drehungsvermögen auch hier, wie in anderen Gruppen aktiver Substanzen, außerordentlich wechselnd. Multirotation wurde bisher nicht beobachtet; ich werde aber, namentlich bei den komplizierteren Substanzen, darauf noch sorgfältig achten, weil ihr Auftreten ein Merkzeichen für die Existenz von leicht veränderlichen Isomeren sein würde.

Gegen Posphorwolframsäure verhalten sich die einfachen Dipeptide ungefähr so wie die α-Aminosäuren. Mit der Länge der Kette wächst aber die Fällbarkeit. Schon manche Tripeptide, wie Leucyl-glycyl-glycin werden in nicht zu verdünnter, schwefelsaurer Lösung durch Phosphorwolframsäure sofort gefällt, und derselben Erscheinung begegnet man bei fast allen Tetrapeptiden; die Niederschläge lösen sich meistens im Überschuß des Fällungsmittels. Daß die Derivate der Diaminosäuren diese Fällung besonders leicht erleiden, kann nicht überraschen.

Alle gewöhnlichen Polypeptide färben sich beim Kochen der wässerigen Lösung mit gefälltem Kupferoxyd sofort blau, oder zuweilen auch blau-violett; sie unterscheiden sich dadurch von den zyklischen Diketopiperazinen, die beim kurzen Kochen diese Färbung nicht geben.

Eine Ausnahme bildet auch hier das Leucyl-prolin, das wohl infolge seiner eigenartigen Struktur selbst beim längeren Kochen kein Kupferoxyd aufnimmt und deshalb keine Färbung liefert.

Die meisten Kupfersalze der Polypeptide sind in Wasser leicht löslich und ziemlich schwierig zu kristallisieren. Einige lösen sich auch in Alkohol; analysiert sind bisher nur wenige. Das schönste davon ist das Kupfersalz des Leucyl-glycins, das die etwas ungewöhnliche Formel[1])

$$(C_8H_{15}O_3N_2Cu)_2O + H_2O$$

hat. Einfacher zusammengesetzt ist das Salz des Phenylglycyl-glycins, $C_{10}H_{10}O_3N_2Cu$, in welchem zwei Wasserstoffatome des Dipeptids durch das Metall ersetzt sind[2]).

Interessanter als die reinen Kupfersalze sind die Alkali-Kupfer-Verbindungen, die bei der sogenannten Biuretprobe in Betracht kommen. Diese Probe, die bekanntlich als charakteristisch für die natürlichen Peptone angesehen wird, fällt bei einer ganzen Reihe von Polypeptiden positiv aus.

Für die reinen Glycinderivate tritt sie zuerst bei dem Tetrapeptid ein; dagegen habe ich sie schon bei den meisten Tripeptiden anderer Zusammensetzung, wenn auch manchmal ziemlich schwach, gefunden. In der Regel wird sie aber mit der Verlängerung der Kette erheblich stärker. Bemerkenswert ist, daß die Färbung auch bei der Veresterung des Carboxyls intensiver wird, wie der Vergleich zwischen Triglycyl-glycin und seinem Äthylester, der sogenannten Biuretbase von Curtius, zeigt. Dieselbe Wirkung hat die Amidierung des Carboxyls[3]).

Für die praktische Anstellung der Probe bleibt zu beachten, daß man zu der ziemlich stark alkalischen Lösung des Polypeptids das Kupfersalz in relativ kleiner Menge zufügen muß, weil der Überschuß von Kupfer in manchen Fällen die ursprüngliche violette Färbung in blau umschlagen läßt. Von Dipeptiden hat bisher nur das Derivat der Diaminopropionsäure die Reaktion gezeigt, aber ich muß dazu bemerken, daß die Einheitlichkeit und völlige Reinheit dieses Präparats nicht gewährleistet ist.

Derivate und Spaltungen der Polypeptide.

Bei den Polypeptiden spielen die Aminogruppen und das Carboxyl die gleiche Rolle wie bei den Aminosäuren. Daß letzteres in die Säurechloridgruppe verwandelt werden kann, und daß in die Aminogruppe

---

[1]) Ann. d. Chem. **340**, 145. (*S. 480.*)

[2]) Ann. d. Chem. **340**, 193 [1905]. (*S. 517.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1105 [1902]. (*S. 301.*)

sich leicht ein halogenhaltiges Säureradikal einführen läßt, ist schon bei der Besprechung der synthetischen Methoden angeführt. Aber auch andere Acyle können ebenso leicht hier angekuppelt werden, indem man die alkalische Lösung des Polypeptids mit dem betreffenden Säurechlorid schüttelt. Außer einigen Benzoylderivaten wurden so insbesondere auch Verbindungen der β-Naphtalinsulfosäure dargestellt[1]), die meist in Wasser ziemlich schwer löslich sind und sich dann zur Abscheidung oder auch zur Erkennung des betreffenden Polypeptids eignen. Ebenso leicht läßt sich die Carbäthoxylgruppe mit Hilfe von Chlorkohlensäureester[2]) einführen.

Erwähnenswert ist endlich die leichte Bildung der Phenylisocyanat-Verbindungen, die aber hier nicht so wichtig sind, wie für die Abscheidung und Erkennung der Aminosäuren, weil sie keine besonders schöne Eigenschaften haben und auch nicht in die besser kristallisierenden Phenylhydantoïne übergeführt werden können.

Ungleich wichtiger sowohl für die Erkennung und Trennung, als auch für den höheren Aufbau der Polypeptide sind ihre Ester. Sie entstehen ebenso leicht wie die Derivate der Aminosäuren durch Einwirkung von alkoholischer Salzsäure. Vermeidet man dabei längeres Erwärmen, so ist die Gefahr einer Hydrolyse des Polypeptids gering. In einzelnen Fällen, wo die Polypeptide selbst nicht kristallisieren, habe ich ihre Ester oder deren Salze für die Analyse benutzt.

Besonders häufig haben die Ester für weitere Synthesen, oder für die Gewinnung anderer Derivate gedient. Ich will deshalb kurz die Veränderungen zusammenstellen, die bisher bei ihnen beobachtet wurden.

Durch kalte, verdünnte Alkalien lassen sie sich glatt verseifen, ohne daß Hydrolyse des Polypeptids eintritt. Merkwürdigerweise erfolgt diese Verseifung bei der Behandlung mit heißem Wasser durchaus nicht glatt. Die Ester der Dipeptide gehen dabei vielmehr zum Teil in Diketopiperazine über, und die Ester der höheren Peptide erfahren eine kompliziertere Veränderung, die noch nicht genügend aufgeklärt ist. Ähnliche Verhältnisse wurden bei den Dipeptiden der Diaminosäuren und des Isoserins beobachtet.

Durch alkoholisches Ammoniak gehen die Ester der Dipeptide ziemlich glatt in Diketopiperazine über. Ist die Aminogruppe durch ein Säureradical, Benzoyl oder Carbäthoxyl substituiert, so bewirken alkoholisches Ammoniak und flüssiges Ammoniak die Bildung von Amid. Diese Umwandlung scheint unter denselben Bedingungen auch

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3786 [1902]. (*S. 203.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2875 [1901]. (*S. 286.*)

bei den Estern der Tripeptide einzutreten. Auf diesem Unterschied beruht eine recht brauchbare Methode, Dipeptide von den übrigen Polypeptiden zu trennen.

Von den Estern der Aminosäuren unterscheiden sich die Derivate der Polypeptide durch die Unlöslichkeit in Petroläther und durch die geringe Löslichkeit in Äther. Dagegen werden viele von ihnen durch Chloroform in erheblicher Menge aufgenommen und diese Lösung hat meist zur Kombination mit Säurechloriden für den Aufbau höherer Peptide gedient.

Über das Verhalten der Ester der Tri- und Tetra-Peptide beim Erhitzen liegen zwei ältere, unvollständige Mitteilungen von Curtius[1]) und von mir[2]) vor, die oben besprochen sind. In jüngster Zeit habe ich, wie ebenfalls schon erwähnt, den Vorgang ausführlicher bei dem Methylester des Diglycyl-glycins studiert und gefunden, daß dieser Ester sich sehr leicht unter Abgabe von Methylalkohol in den Methylester des Pentaglycyl-glycins verwandelt[3]).

Von salpetriger Säure werden die Polypeptide ähnlich den Aminosäuren in kalter, wässeriger Lösung angegriffen unter Entwickelung von Stickstoff. Die Hoffnung, daß sich hierbei ein scharfer Unterschied zwischen der Amino- und den Iminogruppen zeigen würde, hat sich aber nicht erfüllt. Die Versuche mit den beiden Leucyl-isoserinen und dem Glycyl-leucin[4]) haben nämlich ergeben, daß nicht allein die Amidgruppe, sondern auch ein allerdings schwankender Teil der Iminogruppe als Stickstoff abgelöst wird. Durch diese Beobachtung werden die Schlüsse, die man bezüglich der Bindung des Stickstoffs in den Peptonen und Proteïnen aus dem Verhalten gegen salpetrige Säure gezogen hat, sehr zweifelhaft.

Kaliumpermanganat wird von der Lösung der gewöhnlichen Polypeptide in kohlensaurem Natrium in der Kälte beim kurzen Stehen nicht reduziert. Darin liegt ein scharfer Unterschied gegenüber den ungesättigten Verbindungen, die häufig bei der Synthese von Polypeptiden durch Einwirkung von Ammoniak auf die Halogenacyl-Verbindungen als Nebenprodukte entstehen und sich gegen das Baeyersche Reagens wie die gewöhnlichen ungesättigten Säuren verhalten. Daß bei längerer Einwirkung von Permanganaten in wässeriger Lösung auch eine Oxydation der gewöhnlichen Polypeptide eintritt, ist kürzlich von L. Pollak[5]) für das Glycyl-glycin gezeigt worden.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1300 [1904].
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2501 [1904]. (*S. 352.*)
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 471 [1906]. (*S. 568.*)
[4]) E. Fischer und F. Kölker, Ann. d. Chem. **340**, 177 [1905]. (*S. 505.*)
[5]) Beiträge z. chem. Physiologie u. Pathologie **7**, 16 [1905].

In bezug auf Hydrolyse verhalten sich die künstlichen Polypeptide sehr ähnlich den Peptonen oder Proteïnen. 5-stündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure genügt auch hier, um völligen Zerfall in die Aminosäuren zu bewirken. Beim Erhitzen mit 10-prozentiger Salzsäure auf 100° geht aber die Spaltung schon ziemlich träge vonstatten[1]). Langsam erfolgt auch der Angriff der Alkalien, und bei gewöhnlicher Temperatur ist die Wirkung von überschüssiger Normallauge auf die gewöhnlichen Polypeptide so gering, daß selbst nach 24 Stunden sich kaum eine Veränderung nachweisen läßt. Infolge dieser Beständigkeit können die Polypeptide aus ihren Estern oder sogar aus den Formyl-Verbindungen durch Behandlung mit Alkali gewonnen werden.

Am interessantesten endlich ist das Verhalten der Polypeptide gegen die Verdauungsfermente, insbesondere gegen Pankreassaft. Durch eine ausführliche Studie von Abderhalden und mir[2]), die sich auf 29 Polypeptide erstreckt, ist der Nachweis geführt, daß der Angriff des Pankreassaftes teils von der Natur der Aminosäuren, teils von ihrer Anordnung, ferner von der Länge der Kette und endlich ganz besonders von der Konfiguration des Moleküls abhängig ist. In der Regel werden nur die Kombinationen gespalten, welche aus den in der Natur vorkommenden optisch-aktiven Aminosäuren gebildet sind. Mit Hilfe des Pankreassaftes ist es also möglich, die Polypeptide in biologisch verschiedene Klassen zu scheiden.

Anders ist ihr Verhalten gegen Magensaft, für den bisher keine hydrolytische Wirkung auf fünf der künstlichen Polypeptide beobachtet wurde. Man darf aber erwarten, daß die Fortsetzung dieser Versuche, insbesondere bei den höheren Polypeptiden, auch zu positiven Ergebnissen führen und daß es so vielleicht gelingen wird, eine schärfere Grenze zwischen der Magen- und Darm-Verdauung festzustellen.

III. Proteïne.

Um durch analytischen Abbau einen Einblick in die Struktur der Proteïne zu gewinnen, kann man bei ihrem komplizierten Moleküle selbstverständlich sehr verschiedene Wege einschlagen. Aber von den zahlreichen Spaltungen, die bisher zu dem Zwecke ausgeführt worden sind, hat gerade so wie bei den Polysacchariden nur die Hydrolyse umfassende und sichere Resultate gegeben. Sie führt bekanntlich von den Proteïnen durch verschiedene Zwischenglieder (Albumosen, Peptone) zu den Aminosäuren, und diese werden von der überwiegenden Mehrzahl

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 466 [1906]. (*S. 563.*)
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 52 [1905]. (*S. 595.*)

der Sachverständigen als die wahren Bestandteile der Proteïne betrachtet. Auch der Gedanke, daß die Aminosäuren in jenen komplizierten Gebilden anhydridartig verkuppelt sind, dürfte den meisten Forschern, die sich auf diesem Gebiete betätigt haben, geläufig gewesen sein, wenn auch damit keineswegs, wie ich später zeigen will, alle Möglichkeiten erschöpft sind.

Auf die Untersuchung der hydrolytischen Spaltprodukte sind auch meine Untersuchungen vorzugsweise gerichtet gewesen, weil ich die Überzeugung habe, daß durch ihre Erforschung der Synthese am raschesten der richtige Weg gewiesen wird.

Die Hydrolyse kann bekanntlich durch Säuren, Alkalien oder Fermente bewirkt werden. Die erste Methode führt am raschesten zu den Endprodukten und ist deshalb von mir in der Regel dort benutzt worden, wo es sich um das Studium der Aminosäuren handelte. Alkalien wirken langsamer, und ihre Anwendung hat vor den Säuren keinen Vorteil; bei den Fermenten endlich bleibt die Hydrolyse stets unvollkommen. Ich werde die drei Methoden getrennt behandeln.

Bei der Mehrzahl der Proteïne entsteht als Endprodukt ein verwickeltes Gemisch von Aminosäuren, deren Trennung eine recht schwierige Aufgabe ist. Für einzelne Aminosäuren, wie Tyrosin, Cystin und Asparaginsäure, kannte man zwar schon lange leicht ausführbare Isolierungsmethoden, und für die Diaminosäuren, Arginin, Lysin und Histidin sind namentlich durch die Bemühungen von A. Kossel die Trennungsverfahren so vollständig geworden, daß sie zuverlässige quantitative Bestimmungen gestatten.

Außerordentlich schwierig war dagegen früher die Trennung der einfachen Aminosäuren, des Glykocolls und seiner Homologen, und wer jemals versucht hat, in der früher üblichen Weise durch bloße Kristallisation reines Leucin herzustellen, selbst aus Gemischen, die reich daran sind, der wird die Unvollkommenheit des Trennungsverfahrens bitter beklagt haben.

Diese Schwierigkeit glaube ich nun großenteils beseitigt zu haben durch ein neues Trennungsverfahren für Aminosäuren, das ich die „Estermethode" genannt habe, und das im wesentlichen auf der fraktionierten Destillation der Ester beruht. Dadurch wird eine ziemlich weitgehende Scheidung erreicht, und die aus den Estern durch Verseifung regenerierten Aminosäuren können dann verhältnismäßig leicht durch Kristallisation oder durch besondere Fällungsmethoden isoliert werden.

Ich will zunächst eine genaue Beschreibung des Verfahrens mit seinen verschiedenen Modifikationen geben und dann die mit seiner Hilfe erzielten Resultate zusammenstellen.

Hydrolyse der Proteïne durch Säuren und Trennung der Aminosäuren durch die Estermethode.

Für die praktische Hydrolyse kommen nur Salzsäure und Schwefelsäure in Betracht. Letztere hat den Vorzug, daß sie nach beendigter Operation durch Baryumhydroxyd vollständig entfernt werden kann. Da aber diese Operation immerhin ziemlich unbequem ist, so wird man Schwefelsäure nur da anwenden, wo einzelne Produkte, wie besonders das Tyrosin und die Diamino-trioxy-dodekansäure, durch direkte Kristallisation aus wässeriger Lösung isoliert werden sollen.

Nach meinen Erfahrungen wird die Spaltung am besten durch 12—15-stündiges Kochen des Proteïns mit der 5—6-fachen Menge 25-prozentiger Schwefelsäure am Rückflußkühler bewerkstelligt. Die, wenn nötig, filtrierte saure Flüssigkeit verdünnt man dann noch mit dem doppelten Volumen Wasser und fällt die Schwefelsäure durch Zusatz von Baryumcarbonat oder durch eine konzentrierte Lösung von Baryumhydroxyd. Schließlich muß der in Lösung gegangene Baryt durch Schwefelsäure genau gefällt werden. Damit Verluste an Aminosäuren ausgeschlossen werden, ist der massenhafte Niederschlag von Baryumsulfat stark abzunutschen und mehrmals mit Wasser auszukochen; dies ist besonders nötig, um das schwer lösliche Tyrosin völlig zu gewinnen.

Viel bequemer ist die Anwendung der Salzsäure, und man wird sie deshalb überall dort bevorzugen, wo es auf die Gewinnung von Tyrosin und ähnlichen Produkten nicht ankommt. Für die Ausführung der Hydrolyse wird der Proteïnstoff mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) in einem Kolben übergossen, dann einige Zeit unter häufigem Umschwenken stehen gelassen, wobei die meisten Proteïne, u. a. auch die widerstandsfähigen Gerüstsubstanzen, wie Fibroïn, Horn usw., schon zum großen Teil in Lösung gehen. Dann erwärmt man am Rückflußkühler bis zum Kochen und setzt diese Operation 5—6 Stunden fort. Dabei entweicht natürlich ein Teil der Salzsäure gasförmig, und es bleibt schließlich eine Säure von ungefähr 25% zurück. In den meisten Fällen färbt sich die Lösung erst dunkelviolett und dann tief dunkelbraun. Häufig werden Huminsubstanzen oder fettsäureähnliche Massen ausgeschieden. Man filtriert deshalb die, wenn nötig, mit etwas Tierkohle aufgekochte Flüssigkeit nach dem Erkalten durch gehärtetes Papier oder Asbest und wäscht mit wenig Wasser nach. Die salzsaure Lösung wird entweder auf dem Wasserbade in einer Porzellanschale oder besser unter vermindertem Druck in einem Kolben eingedampft. Enthält die Masse Glutaminsäure in größerer Menge, so empfiehlt es sich, sie direkt als Hydrochlorat abzuscheiden.

Zu dem Zweck sättigt man die sehr stark konzentrierte Lösung nochmals in der Kälte mit gasförmiger Salzsäure und läßt einige Tage im Eisschrank stehen. Um den Kristallbrei filtrieren zu können, ist es ratsam, ihn mit etwa dem gleichen Volumen eiskalten Alkohols zu vermischen, dann abzusaugen und mit wenig eiskaltem Alkohol nachzuwaschen. Die salzsaure Glutaminsäure ist leicht durch Aufkochen der wässerigen Lösung mit Tierkohle und abermalige Fällung mit gasförmiger Salzsäure zu reinigen.

Die salzsaure Mutterlauge, oder, bei Abwesenheit von größeren Mengen Glutaminsäure, die ursprüngliche salzsaure Lösung, dient für die Bereitung der Ester. Sie wird zu dem Zweck am besten unter geringem Druck möglichst stark eingedampft, dann der Rückstand mit absolutem Alkohol übergossen und gasförmige, trockne Salzsäure ohne Abkühlung, zuletzt sogar unter Erwärmung auf dem Wasserbade bis zur Sättigung eingeleitet. Auf 500 g Proteïn verwendet man $1^1/_2$ l Alkohol. Da bei der Veresterung ziemlich viel Wasser entsteht, das der Reaktion schädlich ist, so empfiehlt es sich, die salzsaure alkoholische Lösung unter stark vermindertem Druck (bei 15—30 mm) aus einem Bade, dessen Temperatur nicht über 50° geht, stark einzudampfen, den Rückstand wieder mit $1^1/_2$ l absolutem Alkohol zu übergießen und abermals mit Salzsäure zu sättigen. Eine zweite Wiederholung der ganzen Operation steigert noch die Ausbeute an Ester. Selbstverständlich kann man auch die Menge des Alkohols von vornherein größer wählen und kommt dann mit einmaliger Wiederholung der Veresterung aus. Eine wesentliche Zeitersparnis bedeutet dies aber nicht, weil das Sättigen der großen Flüssigkeitsmasse mit Salzsäure unbequem wird.

Enthält das Produkt größere Mengen von Glykocoll, so wird dieses jetzt am bequemsten als Esterchlorhydrat abgeschieden. Man läßt deshalb die mit Salzsäure gesättigte, alkoholische Lösung, am besten nach Einimpfen eines Kriställchens, 12 Stunden bei 0° stehen, wobei es vorteilhaft ist, die Kristallisation durch Umrühren oder durch Reiben der Glaswände zu befördern. Das salzsaure Salz wird in der Kälte abgesaugt und mit eiskaltem Alkohol gewaschen. Einmaliges Umkristallisieren des Produktes aus heißem Alkohol genügt zur Reinigung, und das Präparat hat dann den Schmp. 144° und kann durch die Analyse leicht identifiziert werden.

Um die Abscheidung zu vervollständigen, konzentriert man die Mutterlauge, sättigt wieder mit Salzsäure und läßt abermals nach Einimpfen unter häufigem Rühren mehrere Stunden in der Kältemischung stehen. Es gelingt so, den allergrößten Teil des Glykocolls zu entfernen, wodurch die spätere Fraktionierung der Ester sehr erleichtert wird. Bei kleinen Mengen von Glykocoll findet in dem komplizierten

Gemisch keine Kristallisation statt; es läßt sich dann aber nach der Fraktionierung der Ester aus den ersten Destillaten als Esterchlorhydrat isolieren. Die vom Glykocollester-chlorhydrat abfiltrierte, salzsaure, alkoholische Lösung wird jetzt unter stark vermindertem Druck bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur aus dem Wasserbade möglichst stark verdampft; der Rückstand enthält die Hydrochlorate der übrigen Aminosäureester. Man kann daraus die freien Ester entweder mit konzentriertem Alkali und Äther isolieren oder die Hydrochlorate in alkoholischer Lösung mit der berechneten Menge Natriumalkylat zersetzen.

Die erste Methode habe ich am häufigsten angewandt, weil dabei schon eine Entfernung des Tyrosins und der Diaminosäuren stattfindet. Man versetzt zu dem Zweck den dicken Sirup direkt in dem Destillationskolben, welcher der Bequemlichkeit halber nicht mehr als 250 g des ursprünglichen Proteïns enthalten soll, mit dem halben Volumen Wasser und dem etwa $1^1/_2$-fachen Volumen Äther, kühlt in einer Mischung aus Eis und Kochsalz sorgfältig ab, fügt dann so viel starke Natronlauge hinzu, daß die freie Salzsäure neutralisiert ist, und endlich einen erheblichen Überschuß von fein gekörntem, festem Kaliumcarbonat.

Diese Operation hat den Zweck, die schwach-basischen Ester der Asparagin- und Glutaminsäure, welche gegen freies Alkali besonders empfindlich sind, abzuscheiden. Nach gutem Durchschütteln wird der Äther abgegossen, durch neuen ersetzt und zu der wiederum sehr sorgfältig gekühlten Masse in verschiedenen Portionen 33-prozentige Natronlauge und festes Kaliumcarbonat zugegeben. Nach jedesmaligem Zusatz wird kräftig umgeschüttelt, um das Alkali in der steifen Masse zu verteilen und den frei gewordenen Ester sofort in die ätherische Lösung überzuführen. Es ist vorteilhaft, den Äther mehrmals zu erneuern. Die Menge des Alkalis muß wenigstens so groß sein, daß sie zur Bindung sämtlicher Salzsäure ausreicht, und Kaliumcarbonat ist so viel zuzufügen, daß die Salzmasse einen dicken Brei bildet, denn nur dann werden die in Wasser äußerst leicht löslichen Ester der einfachen Aminosäuren ausgesalzen. Ganz besonders gilt das für die Fälle, wo Glykocoll, Alanin und Serin zu isolieren sind. Während der ganzen Operation soll die Temperatur des alkalischen Gemisches möglichst niedrig sein. Man erreicht das nur durch wiederholtes und kräftiges Schütteln in der Kältemischung.

Die vereinigten ätherischen Auszüge, welche braun gefärbt sind, werden etwa 15 Minuten mit Kaliumcarbonat geschüttelt, dann abgegossen und einige Stunden mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet, da die übrigen Trockenmittel, wie Ätzkali, Kalium- und Baryum-Oxyd

oder selbst das Kaliumcarbonat, bei längerer Einwirkung etwas Ester zersetzen.

Beim Abdampfen des Äthers gehen nur kleine Mengen von Glykocoll- und Alaninester in das Destillat; will man sie nicht verlieren, so ist es nötig, dasselbe mit wenig verdünnter Salzsäure durchzuschütteln. Beim Abdampfen der salzsauren Lösung bleiben dann die Hydrochlorate der Aminosäuren zurück.

Geringer ist die Gefahr, Aminosäuren zu verlieren, wenn der Äther bei gewöhnlicher Temperatur unter vermindertem Druck verdampft wird. Dabei wird auch noch die Möglichkeit, einen Teil der Ester durch die höhere Temperatur zu zerstören, beseitigt. Die als dunkles Öl hinterbleibenden Ester werden dann unter vermindertem Druck destilliert. Ich habe diese Operation früher unter dem Druck, wie man ihn mit der Wasserstrahlpumpe erhält (8—15 mm), ausgeführt. Besser werden aber die Resultate, wenn bei den höheren Fraktionen der Druck unter 1 mm herabgesetzt ist. Das gelingt leicht mit Hilfe des Apparates, den ich in Gemeinschaft mit C. Harries vor einigen Jahren beschrieben habe[1]). Ich will bei dieser Gelegenheit bemerken, daß die von anderer Seite für den gleichen Zweck gemachten Vorschläge in diesem Falle unbrauchbar sind, da es sich hier um Flüssigkeiten handelt, die erhebliche Mengen von Äther, Alkohol und Wasser enthalten, und da außerdem geringe Mengen von Gasen entwickelt werden. Alle diese Dämpfe lassen sich nur dann rasch entfernen, wenn man für genügende Abkühlung, am besten durch flüssige Luft, und für gleichzeitige rasche Evakuierung der Gefässe sorgt.

Am bequemsten scheint es mir, die Destillation zuerst an der Strahlpumpe und später unter dem geringen Druck auszuführen. Dementsprechend verfährt man folgendermaßen:

Das durch Verdampfen bei gewöhnlicher Temperatur unter dem Druck der Strahlpumpe vom Äther möglichst befreite Gemisch der Ester wird unter demselben Druck mit gleichzeitiger Erhitzung im Wasserbade weiter destilliert und in etwa 3 Fraktionen (bis 60°, bis 80° und bis 100°) geteilt, wobei die Temperaturangaben für das Bad und nicht für die Dämpfe gelten. Die Destillation wird jetzt unter etwa 0,5 mm Druck fortgesetzt, bis bei der Temperatur des siedenden Wassers nichts mehr übergeht. Man ersetzt dann das Wasserbad durch ein Ölbad und destilliert in 2—3 Fraktionen, bis die Temperatur des Bades auf 160° gestiegen ist. Ich halte es jetzt für vorteilhaft, die Gesamtmenge der Ester, die bis 100° destilliert sind, unter einem Druck von etwa 10 mm über freier Flamme nochmals zu fraktionieren und dabei

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2158 [1902].

die Temperatur der Dämpfe als Maßstab für die Scheidung zu benutzen. Die Zahl der Fraktionen und die Temperaturintervalle hängen selbstverständlich von der Zusammensetzung des Gemisches ab. Im allgemeinen wird man mit 4 Fraktionen zwischen 40° und 100° auskommen. Sie enthalten außer kleinen Mengen von Glykocollester das Alanin, das Prolin, die α-Amino-valeriansäure, den allergrößten Teil des Leucins und jedenfalls auch das Isoleucin. In dem Teil, der unter 0,5 mm Druck über 100° siedet, sind hauptsächlich enthalten: die Ester der Asparaginsäure und Glutaminsäure, fast die gesamte Menge des Phenylalanins, ferner des Serins, zuweilen der Pyrrolidoncarbonsäure als Zersetzungsprodukt des Glutaminsäureesters und Produkte unbekannter Zusammensetzung.

In dem Destillationsrückstand, der ein dunkles, zähes, in der Kälte meist glasartig erstarrendes Öl ist, finden sich neben unbekannten Stoffen wechselnde Mengen von Diketopiperazinen, z. B. Leucinimid.

Eine nochmalige Fraktionierung der bei 0,5 mm über 100° siedenden Ester hat keinen besonderen Wert. Sehr vorteilhaft ist dagegen die Abscheidung des Phenylalaninesters durch seine leichte Löslichkeit in Äther. Will man sie benutzen, so versetzt man das Gemisch der Ester (Sdp. 100—130°) mit der 4—5-fachen Menge Wasser; ist wenig Phenylalanin vorhanden, so findet fast klare Lösung statt, da die Ester der Asparagin- und Glutaminsäure und des Serins, sowie anderer Oxyaminosäuren in Wasser leicht löslich sind. Ist die Menge des Phenylalanins größer, so bleibt der Ester zum Teil ölig in der wässerigen Lösung suspendiert. Unter allen Umständen schüttelt man die Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Äther, trennt die ätherische Schicht ab und schüttelt sie dreimal hintereinander mit dem gleichen Volumen Wasser. Dadurch werden die Ester von Asparagin- und Glutaminsäure, die von dem Äther aufgenommen wurden, wieder entfernt, und beim Verdampfen der ätherischen Lösung bleibt jetzt der Phenylalaninester schon ziemlich rein zurück.

Ein anderes wertvolles Trennungsverfahren beruht auf der Unlöslichkeit des Serinesters in Petroläther. Versetzt man also die Fraktion, die ihn enthält, mit einigen Prozent Wasser und dann mit dem 5—8-fachen Volumen Petroläther, so scheidet er sich als Öl ab, während Leucin, Phenylalanin und der größte Teil des Asparagin- und Glutamin-Säureesters in Lösung bleiben. Man kann den ausgeschiedenen Serinester noch mehrmals mit Petroläther durchschütteln, um die obenerwähnten Beimengungen möglichst zu entfernen, und benutzt schließlich das Präparat zur Gewinnung von Serin.

Nachdem die Trennung der Ester bis zu diesem Punkte durchgeführt ist, müssen sie in die Aminosäuren zurückverwandelt werden.

Das geschieht für die Fraktionen, die unter 100° sieden, durch mehrstündiges Kochen mit der 5-fachen Menge Wasser am Rückflußkühler. Das Ende der Verseifung erkennt man an dem Verschwinden der alkalischen Reaktion. Bei der Fraktion, die große Mengen Leucin enthält, findet während der Operation die Abscheidung der schwer löslichen Aminosäure statt.

Die Verseifung derjenigen Fraktion, die Glutamin- und Asparaginsäure enthält, geschieht durch Baryumhydroxyd, weil beim Kochen mit Wasser die Reaktion bei der Bildung von sauren Estern stehen bleibt, deren Anwesenheit die Erkennung der Aminosäuren erschwert. Man versetzt also die wässerige Lösung der betreffenden Ester, die nach der Abtrennung des Phenylalaninesters resultiert, mit einem Überschuß einer ziemlich konzentrierten Lösung von Baryumhydroxyd und erhitzt 1—$1^1/_2$ Stunden auf dem Wasserbade. Sind größere Mengen von Asparaginsäure vorhanden, so fällt bei dieser Operation asparaginsaures Baryum aus, das in der Regel zum großen Teil aus Racemkörper besteht. Man kann diesen Niederschlag filtrieren und daraus direkt die Asparaginsäure in bekannter Weise isolieren. Die wässerige Lösung wird mit Schwefelsäure genau vom Baryt befreit und am besten unter vermindertem Druck eingedampft.

Die Verseifung des Phenylalaninesters geschieht endlich durch ein- bis zweimaliges Abrauchen mit starker Salzsäure. Man erhält dabei das salzsaure Salz, das leicht durch Kristallisation aus starker Salzsäure gereinigt werden kann.

Bei allen zuvor erwähnten Operationen ist selbstverständlich die leichte Veränderlichkeit der Aminosäureester zu berücksichtigen. Man tut deshalb gut, die Destillation zu beschleunigen und auch die Verseifung der Ester nach Beendigung ihrer Trennung möglichst bald, spätestens aber im Laufe von 24 Stunden für die niedrig siedenden Teile, auszuführen.

Für die Erkennung der einzelnen Aminosäuren in diesen Fraktionen dienen die später einzeln angeführten Methoden.

Die Abscheidung der Ester aus dem rohen Gemisch der Hydrochlorate durch Alkali, Kaliumcarbonat und Äther hat den Vorzug, daß dabei das Tyrosin, dessen Ester eine Alkaliverbindung bildet und die Derivate der Diaminosäuren, die in Äther sehr schwer löslich sind, entfernt werden. Es hat aber andererseits den Nachteil, daß eine wechselnde Menge der gesuchten Ester durch das Alkali zerstört und deshalb der Extraktion durch Äther entzogen wird. Will man diesen Verlust wieder einbringen, so ist es nötig, die alkalische, mit großen Mengen Kaliumcarbonat durchsetzte Masse nach Abtrennung des Äthers mit Salzsäure zu übersättigen, dann einzudampfen, wobei man zeit-

weise das massenhaft auskristallisierende Chlorkalium entfernt, schließlich den Rückstand mit Alkohol auszulaugen und die Veresterung sowie die Abscheidung der Ester durch Alkali zu wiederholen. Auch hierbei tritt selbstverständlich wieder ein Verlust ein, der jetzt aber verhältnismäßig klein ist. Immerhin bringt diese Methode wegen der großen Masse von konzentrierten Salzlösungen viel lästige Arbeit mit sich.

In manchen Fällen, wo es auf die möglichst vollständige Gewinnung der Aminosäuren ankommt, scheint es mir deshalb bequemer zu sein, die Ester aus den Hydrochloraten nicht durch Alkali, sondern durch Natriumäthylat in Freiheit zu setzen. Man löst zu dem Zweck den durch starkes Verdampfen von überschüssiger Salzsäure möglichst befreiten dicken Sirup, der das Gemisch der salzsauren Ester enthält, etwa in der 5-fachen Menge absolutem Alkohol, bestimmt in einer kleinen Quantität dieser Flüssigkeit den Chlorgehalt und fügt nun, ganz in der Kälte, eine ebenfalls gut gekühlte, etwa 3-prozentige alkoholische Lösung von Natrium in berechneter Menge unter gutem Rühren zu. Dabei fällt eine erhebliche Menge von Kochsalz aus, das abgesaugt und mit kaltem, absolutem Alkohol nachgewaschen wird. Die alkoholische Lösung wird jetzt unter stark vermindertem Druck eingedampft. Da hierbei nicht unerhebliche Mengen von Aminosäureester in das Destillat gehen, so muß dieses für sich nach dem Ansäuern mit Salzsäure verdampft werden, wobei die Hydrochlorate der Aminosäuren zurückbleiben. Die beim Verjagen des Alkohols hinterbleibenden Ester werden nun erst mit der Wasserstrahlpumpe und dann unter 0,5 mm Druck destilliert bis zu 160° Badtemperatur. Der nicht destillierbare Rückstand ist hier viel reichlicher, weil er auch die Diaminosäuren, das Tyrosin und noch andere komplizierte Stoffe enthält, die bei der anderen Methode in der alkalisch-wässerigen Flüssigkeit bleiben. Bei diesem Verfahren vermeidet man den Verlust von Estern durch Verseifung, aber es entstehen namentlich für die hochsiedenden Produkte größere Verluste bei der Destillation, weil das Estergemisch eine viel kompliziertere Zusammensetzung hat.

Wie leicht begreiflich, kann die Estermethode auch kombiniert werden mit der Gewinnung des Tyrosins und der Diaminosäuren. Man bewirkt dann die Hydrolyse mit Schwefelsäure, scheidet, wie oben beschrieben, das Tyrosin durch Kristallisation ab, fällt aus dem Filtrat nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure die Diaminosäuren durch Phosphorwolframsäure, entfernt aus der abermals filtrierten Lösung den Überschuß der Phosphorwolframsäure mit Baryt, dann den überschüssigen Baryt mit Schwefelsäure und verarbeitet das letzte Filtrat nach der Estermethode.

Bei diesem komplizierten Verfahren ist aber darauf zu achten, daß dem Tyrosin außer Diamino-trioxy-dodekansäure auch wechselnde Mengen der schwer löslichen Monoaminosäuren, insbesondere Leucin, beigemischt sein können, ferner, daß durch Phosphorwolframsäure auch leicht ein Teil der Monoaminosäuren gefällt wird, wenn die Lösung nicht sehr verdünnt ist, und daß endlich das Absaugen und Auswaschen des Phosphorwolframat-Niederschlages mit besonderer Sorgfalt, am besten unter Anwendung von Pressen, geschehen muß, weil er leicht erhebliche Mengen von Mutterlauge in sich schließt.

Aus allen diesen Gründen wird man die kombinierte Methode nur dann anwenden, wenn der Mangel an Untersuchungsmaterial zur Sparsamkeit zwingt. In allen anderen Fällen ist es ratsam, die Prüfung auf Tyrosin, Diamino- und Monoaminosäuren in drei getrennten Operationen vorzunehmen.

Isolierung und Erkennung der einzelnen Monoaminosäuren.

Nach Ausführung der oben beschriebenen Trennung mit Hilfe der Ester ist die Isolierung der einzelnen Produkte immerhin noch eine ziemlich mühsame Aufgabe, besonders wenn es sich um eine halbwegs quantitative Untersuchung handelt. Es scheint mir zweckmäßig, auch diese speziellen Methoden, die natürlich je nach dem Falle wechselnde Modifikationen erfahren können, hier zusammenzustellen.

Glykocoll.

Für seine Erkennung ist die Abscheidung als Esterchlorhydrat bei weitem das beste Mittel. Größere Mengen können so direkt aus dem Gemisch der rohen Ester, wie oben beschrieben, kristallisiert werden. Kleinere Mengen findet man erst nach der Fraktionierung der Ester in dem ersten Anteil, oder auch in den Partien der Ester, die beim Abdampfen des Äthers und Alkohols mit übergehen. Auch die kleinen Mengen von Glykocoll, die noch dem Alanin anhaften können, wenn es aus dem Ester regeneriert ist, werden immer am besten in Form des Esterchlorhydrats abgeschieden. Ein- bis zweimaliges Umkristallisieren des Salzes aus heißem, absolutem Alkohol liefert ein reines Präparat, das durch den Schmp. 144° (korrigiert 145°) und die Analyse leicht identifiziert werden kann.

Das Verfahren gestattet auch eine annähernde quantitative Bestimmung der Aminosäure, das um so bessere Resultate liefert, je größer die Menge des Glykocolls ist. Nach besonderen Kontrollversuchen[1]) gelingt es bei Anwesenheit von 20% Glykocoll im Proteïn

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 229 [1902]. (*S. 693.*)

etwa $^4/_5$ desselben als Esterchlorhydrat aus dem Gemisch der salzsauren Ester abzuscheiden, und von dem Reste findet man dann noch eine nicht unerhebliche Menge bei der späteren Fraktionierung der freien Ester. Das Esterchlorhydrat hat die Formel $C_4H_{10}O_2NCl$ und enthält 53,8% Glykocoll.

Alle kohlenstoffreicheren Aminosäuren finden sich in den Proteïnen in optisch-aktiver Form; sie werden aber bei der Hydrolyse durch Säuren partiell racemisiert. Infolgedessen hat man es stets mit einem Gemisch von racemischer und aktiver Form zu tun, wodurch die Isolierung durch Kristallisation recht erschwert wird. Ich werde auf diesen Punkt später zurückkommen.

Alanin.

Es findet sich vorzugsweise in der Fraktion der Ester, die bei 10 mm Druck von 40—60° siedet, und kann nach der Verseifung mit Wasser in der Regel durch fraktionierte Kristallisation rein gewonnen werden, besonders, wenn seine Menge relativ bedeutend ist. Manchmal enthalten die ersten Kristallisationen noch etwas Leucin oder Aminovaleriansäure. Aus den späteren Fraktionen pflegt aber das Alanin ziemlich rein herauszukommen, vorausgesetzt, daß das Glykocoll sorgfältig vorher abgeschieden war. Ist das nicht der Fall, so empfiehlt es sich, hier nochmals zu verestern und die Abscheidung des Glykocolls als Esterchlorhydrat zu wiederholen. Die salzsaure Mutterlauge wird dann mit Wasser verdampft, aus dem Hydrochlorat die freie Aminosäure durch Kochen mit Bleioxyd in Freiheit gesetzt und durch Kristallisation gereinigt. In den Mutterlaugen kann auch Prolin enthalten sein, das die Gewinnung der letzten Anteile von Alanin erschwert. Es ist dann am besten, die wässerige Lösung ganz zur Trockne zu verdampfen und den Rückstand mit der 5—10-fachen Menge absolutem Alkohol sorgfältig auszukochen. Selbstverständlich kann man diese Operation auch von vornherein vornehmen, ohne sich erst mit der fraktionierten Kristallisation zu bemühen. Ob die eine oder andere Modifikation ratsam ist, hängt von den Mengenverhältnissen der Aminosäuren ab und muß in jedem einzelnen Falle geprüft werden. Das Alanin wird am besten durch die Analyse identifiziert, nachdem eine vorläufige Kontrolle durch den Schmelzpunkt stattgefunden hat. Die rohe Aminosäure ist stets ein Gemisch von optisch-aktiver und racemischer Form. Bei der optischen Prüfung in salzsaurer Lösung findet man deshalb in der Regel eine geringere Drehung, als dem reinen salzsauren *d*-Alanin ($[\alpha]_D^{20^0} = +10{,}3^0$)[1]) entspricht. Nur wenn die Menge der aktiven Amino-

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 464 [1906]. (*S. 561.*)

säure recht groß ist, wie bei der Seide, gelingt es, sie durch Kristallisation aus Wasser rein abzuscheiden. Will man noch weitere Beweise für das Vorliegen von Alanin haben, so empfiehlt sich die Darstellung der Benzoylverbindung mit Bicarbonat und Benzoylchlorid und deren Analyse. Dabei ist aber zu beachten, daß der Schmelzpunkt des Präparates unscharf sein kann, da es ein Gemisch von optisch-aktiver und racemischer Form zu sein pflegt.

Prolin (Pyrrolidin-α-carbonsäure).

Es ist in Wasser sehr leicht löslich und findet sich hauptsächlich in der Fraktion, die Leucin und Aminovaleriansäure enthält, ist aber in kleiner Menge auch dem Alanin beigemengt. Man erhält es, indem man die wässerigen Lösungen der Fraktionen eindampft, eventuell unter Abfiltrieren der auskristallisierenden Partien, und dann den trocknen Rückstand in zerkleinertem Zustand mehrmals mit der 5-fachen Menge absolutem Alkohol sorgfältig auskocht. Die alkoholischen Auszüge von den verschiedenen Fraktionen werden vereinigt, zur Trockne verdampft und der kristallinische Rückstand abermals mit der 5-fachen Menge absolutem Alkohol gekocht. Dabei bleibt in der Regel wieder eine kleine Menge von gewöhnlichen Aminosäuren zurück. Das Eindampfen der alkoholischen Lösung und die Wiederaufnahme mit Alkohol muß eventuell nochmals wiederholt werden. Man erhält jetzt ein Präparat, das zum größten Teil aus Prolin besteht, aber wieder ein Gemisch von aktiver und racemischer Form ist. Um diese zu trennen, löst man die Masse in Wasser und kocht bis zur Sättigung etwa $^1/_2$ Stunde mit überschüssigem, gefälltem Kupferoxyd. Das tiefblaue Filtrat wird auf dem Wasserbade verdampft und der zerkleinerte Rückstand zweimal mit der 5-fachen Menge heißem, absolutem Alkohol sorgfältig ausgelaugt. Dabei bleibt der größte Teil des racemischen Prolinkupfers ungelöst, und aus dem heißen Filtrat scheidet sich häufig noch eine kleine Menge des Salzes ab. Dieses Kupfersalz kann jetzt in der Regel durch Umkristallisieren aus heißem Wasser völlig gereinigt und durch die Analyse (Gehalt an Kristallwasser und Kupfer) identifiziert werden. Qualitativ erkennt man schon längst vorher das Prolin an dem charakteristischen Geruch von Pyrrolidin, der sich beim Eindampfen des Kupfersalzes kund gibt. In der alkoholischen Mutterlauge ist das Kupfersalz des aktiven Prolins. Es wird nach dem Verdampfen des Alkohols in Wasser gelöst, durch Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat unter vermindertem Druck verdampft. Das Prolin muß sich jetzt in absolutem Alkohol klar lösen; ist das nicht der Fall, so enthält es noch gewöhnliche Aminosäuren. Man kann das Prolin aus der alkoholischen Lösung oder durch Pyridin aus der konzentrierten, wässerigen Lösung kristallinisch

abscheiden und den Schmelzpunkt bestimmen. Bequemer aber als die Isolierung der reinen Verbindung ist die Darstellung ihres Phenylhydantoïns[1]), das einen konstanten Schmelzpunkt (144° korrigiert) besitzt und deshalb leicht zu identifizieren ist.

Die quantitative Bestimmung des Prolins ist ziemlich roh; sie gibt aber trotzdem vergleichbare Zahlen, wenn man das in Alkohol völlig lösliche Produkt nach sorgfältigem Trocknen wägt; denn der kleine Fehler, den man infolge der Verunreinigungen nach oben macht, dürfte ungefähr kompensiert sein durch die Verluste, die bei der Isolierung und Fraktionierung der Ester entstehen. Genauer ist natürlich die Wägung des racemischen Prolinkupfers, aber sie hat keine Bedeutung, da das Verhältnis von Racemkörper und aktiver Aminosäure wechselt und es nur auf die Gesamtausbeute an Prolin ankommt. Diese ist deshalb in der Regel nach dem Gewicht des in Alkohol völlig löslichen rohen Präparates angegeben.

α-Amino-valeriansäure.

Sie findet sich zusammen mit dem Leucin in den Fraktionen der Ester, die bei 60—90° sieden, und ihre Abscheidung ist so schwierig, daß sie meist mißlingt, wenn nur kleinere Mengen vorhanden sind. Für ihre Isolierung habe ich die fraktionierte Kristallisation der freien Aminosäuren und des Kupfersalzes in wechselnder Reihenfolge benutzt. Eine Vorschrift zu geben, die für alle Fälle paßt, ist nicht möglich, da die Verhältnisse mit den Mengen zu sehr wechseln. Für die Identifizierung kommt in erster Linie die Elementaranalyse, dann aber auch das Drehungsvermögen in salzsaurer Lösung in Betracht. Am leichtesten ist mir die Abscheidung gelungen bei der Hydrolyse des Horns, und ich verweise deshalb auf die betreffende Abhandlung[2]). Aber selbst in diesem Falle war es sehr schwer zu sagen, daß das Produkt absolut rein sei. Dagegen ist dort der Beweis geliefert, daß die Verbindung aller Wahrscheinlichkeit nach die Struktur einer α-Amino-isovaleriansäure hat. Die Aminosäure hat in salzsaurer Lösung ein wesentlich stärkeres Drehungsvermögen als das Leucin. Ihre Trennung von dem Leucin wird besonders durch den Umstand erschwert, daß sie mit jenem Mischkristalle bildet, und daß solche Mischkristalle auch bei den Kupfersalzen der beiden Aminosäuren existieren[3]). Die Amino-valeriansäure ist in kleinerer Menge auch in der Fraktion des Alanins enthalten, und

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 168 [1901]. (*S. 647.*)

[2]) E. Fischer und Th. Dörpinghaus, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 469 [1902]. (*S. 708.*)

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 162 [1901]. (*S. 642.*)

sie geht endlich beim Auskochen des Prolins mit Alkohol in kleiner Menge in Lösung. Leichter wird die Isolierung der α-Amino-valeriansäure, wenn man das Gemisch mit Leucin zuvor racemisiert, wie es sogleich beschrieben werden soll, und in diesem Falle empfiehlt es sich, die durch Kristallisation möglichst gereinigte Aminosäure noch in das Phenylhydantoïn umzuwandeln[1]).

Leichter als bei den gewöhnlichen Proteïnen ist nach den Beobachtungen von Kossel und Dakin[2]) die Isolierung der Amino-valeriansäure bei einzelnen Protaminen, wie dem Salmin, weil hier das Leucin fehlt.

Leucin.

Es findet sich hauptsächlich in den Fraktionen der Ester, die bei 10 mm Druck von 70—90° sieden. Da die Menge des Leucins bei den meisten Proteïnen verhältnismäßig groß ist, so gelingt es in der Regel leicht, durch Kristallisation der aus den Estern regenerierten Aminosäuren Präparate in erheblicher Menge zu gewinnen, welche die Zusammensetzung des Leucins haben; es handelt sich dabei immer um das *l*-Leucin, das in salzsaurer Lösung nach rechts dreht. Sobald man aber die Präparate optisch untersucht, findet man, daß sie keineswegs einheitlich sind. Bei den schwerlöslichen Fraktionen ist häufig das Drehungsvermögen zu gering, weil relativ viel Racemkörper vorhanden ist, und bei den leichter löslichen wird das Drehungsvermögen häufig zu hoch gefunden. Da die Elementar-Analyse scharfe Werte gibt, so handelt es sich hier sehr wahrscheinlich um eine Beimengung des von F. Ehrlich[3]) entdeckten und so sorgfältig studierten *d*-Isoleucins, das nach seinen interessanten Beobachtungen ein Bestandteil der meisten Proteïnstoffe zu sein scheint. Ich habe mich mit der Trennung dieses Stoffes von dem Leucin nicht näher beschäftigt und muß mich mit der Bemerkung begnügen, daß die Präparate, die als Leucin von mir oder meinen Mitarbeitern angeführt sind, vielfach ein Gemisch von Leucin und Isoleucin sein können.

Erheblich leichter wird die Gewinnung von reinem Leucin aus Proteïnen, wenn man auf die Isolierung der aktiven Substanzen verzichtet und das zu trennende Gemisch der Aminosäuren zuvor vollständig racemisiert. Das geschieht in der bekannten, von E. Schulze vorgeschlagenen Weise durch Erhitzen mit Baryt auf 160—180°. Bei

---

[1]) E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 160 [1901] (*S. 642*) und **36**, 470 [1902]. (*S. 709.*)

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **40**, 565 [1903].

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1809 [1904]; ferner Zeitschr. Ver. Rübenzucker-Ind. **1905**, 539 oder Chem. Centralblatt **1905**, II, 156.

größerer Menge habe ich diese Operation im Autoklaven ausgeführt und als Gefäß einen Porzellanbecher benutzt, der von dem Baryt bei der hohen Temperatur viel weniger als Glas angegriffen wird. Da das Leucin auch bei Gegenwart von Baryt in Wasser nicht leicht löslich ist, so habe ich in der Regel auf 1 Teil der rohen Aminosäure 20 Teile Wasser und 2—3 Teile kristallisiertes Barythydrat verwendet. Beim 24-stündigen Erhitzen auf 170—175° ist die Racemisierung sicher vollständig. Der Baryt wird aus der wässerigen Lösung am bequemsten durch Einleiten von Kohlensäure entfernt; dabei ist aber zu beachten, daß das racemische Leucin selbst in heißem Wasser keineswegs leicht löslich ist. Die Ausfällung des Baryts geschieht deshalb am besten in recht verdünnter und heißer Lösung. Beim Eindampfen der vom Baryumcarbonat filtrierten Flüssigkeit kristallisiert zuerst das schwerlösliche, racemische Leucin, das durch die Überführung in das Phenylhydantoïn bzw. die Benzoyl- oder die Benzolsulfosäure-Verbindung sicher identifiziert werden kann, da alle diese Derivate bestimmte Schmelzpunkte haben. Die dem ursprünglichen Produkt beigemengte Amino-valeriansäure ist in der racemischen Form in Wasser viel leichter löslich und findet sich deshalb in den Mutterlaugen. Das gleiche scheint für das Isoleucin zuzutreffen.

Aus der eben geschilderten Schwierigkeit, reines Leucin (besonders in der aktiven Form) aus dem Gemisch der Aminosäuren abzuscheiden, ergibt sich schon, daß von einer genauen quantitativen Bestimmung dieser Aminosäure nicht die Rede sein kann. Die Zahlen, die für Leucin in den zahlreichen, aus dem hiesigen Institut publizierten Hydrolysen von Proteïnen angegeben sind, beziehen sich alle nicht auf das ganz reine Präparat, sondern vielmehr auf ein Gemisch mit Isoleucin, dem auch noch wechselnde Mengen von Aminovaleriansäure beigemengt sein können. Trotzdem sind die Zahlen wahrscheinlich in den meisten Fällen nicht zu hoch, da bei der Isolierung und Fraktionierung der Ester und auch bei der späteren Kristallisation der Aminosäuren erhebliche Verluste unvermeidlich sind.

Phenylalanin.

Die zuvor beschriebene Abtrennung seines Esters ist so vollständig, daß die Reinigung keine Schwierigkeiten bietet. Es genügt, das durch Verseifung mit Salzsäure erhaltene Hydrochlorat einmal aus starker Salzsäure umzukristallisieren, dann mit überschüssigem, wässerigem Ammoniak zu verdampfen, aus dem Rückstand das Chlorammonium mit wenig eiskaltem Wasser wegzulaugen und die Aminosäure aus der heißen, wässerigen Lösung durch Alkohol zu fällen. Dieses Präparat gibt in der Regel bei der Elementar-Analyse scharf stimmende Werte;

es ist aber gleichfalls ein Gemisch von aktiver und racemischer Form. Eine sehr scharfe, qualitative Probe auf Phenylalanin habe ich in der Umwandlung in Phenylacetaldehyd gefunden[1]. Man löst zu dem Zweck die Aminosäure in verdünnter Schwefelsäure, fügt einen Überschuß von Kaliumbichromat zu und kocht, wobei der sehr charakteristische Geruch des Aldehyds sich bald bemerkbar macht. Die Probe kann auch mit recht kleinen Mengen ausgeführt werden.

Für die quantitative Bestimmung des Phenylalanins wird direkt das beim Verdampfen des Esters mit Salzsäure hinterbleibende Rohprodukt gewogen, da bei sorgfältiger Ausführung der Ester-Trennung keine anderen Aminosäuren zugegen sind. Selbstverständlich haftet der Bestimmung der Fehler an, der durch Verluste bei der Isolierung und Fraktionierung der Ester entsteht. Will man der Sicherheit halber noch ein Derivat des Phenylalanins von festem Schmelzpunkt darstellen, so empfiehlt es sich, die Aminosäure zu racemisieren und in die Phenylisocyanat-Verbindung bzw. deren Hydantoïn umzuwandeln[2].

Asparaginsäure.

Bei der Trennung der Ester bleibt sie schließlich gemischt mit Glutaminsäure und Serin, und bei der oben geschilderten Verseifung dieser Ester mit Barythydrat scheidet sich häufig ein Teil der Asparaginsäure als schwer lösliches Baryumsalz aus. Seine Umwandlung in die freie Säure und deren völlige Reinigung durch Kristallisation bietet nicht die geringsten Schwierigkeiten. Wie schon erwähnt, ist die aus dem Baryumsalz gewonnene Säure hauptsächlich Racemkörper. Um den in Lösung gebliebenen Teil der Asparaginsäure zu gewinnen, fällt man den Baryt genau mit Schwefelsäure aus und verdampft dann die Flüssigkeit. Ist verhältnismäßig viel Asparaginsäure zugegen, so scheidet sie sich langsam kristallinisch ab und kann dann durch Umlösen aus heißem Wasser gereinigt werden. Häufig ist sie durch Glutaminsäure verunreinigt, von der man sie durch starke Salzsäure, in der das Glutaminsäurechlorhydrat schwer löslich ist, trennen muß. Auch Serin kann die Isolierung der Asparaginsäure erschweren; es ist dann vorteilhaft, die Trennung von Asparaginsäure und Serin schon bei den Estern mit Petroläther vorzunehmen. Charakteristisch ist für die Asparaginsäure einerseits das ziemlich schwer lösliche Kupfersalz und andererseits der ausgesprochen saure Geschmack, wodurch sie sich namentlich von der Glutaminsäure und selbstverständlich auch von den einfachen Aminosäuren unterscheidet.

---

[1] Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 174 [1901]. (*S. 652.*)
[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 173 [1901]. (*S. 651.*)

Glutaminsäure.

Bei größerer Menge ist es durchaus ratsam, sie direkt nach der Hydrolyse des Proteïns mit Salzsäure als schwer lösliches Hydrochlorat abzuscheiden, wie zuvor ausführlich beschrieben wurde. Der Rest der Säure findet sich nach der Trennung durch die Ester bei der Asparaginsäure, und es ist in den meisten Fällen angezeigt, hier die Abscheidung durch starke Salzsäure zu wiederholen. Man löst zu dem Zweck das rohe Gemisch der beiden Säuren in wenig starker Salzsäure, läßt erkalten, sättigt, wenn nötig, noch mit gasförmiger Salzsäure und läßt dann in Eis oder auch in einer Kältemischung 1—2 Stunden stehen. Ist auch nur wenig Glutaminsäure zugegen, so fällt sie als Hydrochlorat aus, das auf Asbest abgesogen und durch Umkristallisieren aus sehr starker Salzsäure gereinigt wird. Um daraus die freie Glutaminsäure zu gewinnen, löst man in wenig Wasser und fügt die zur Bindung der Salzsäure gerade ausreichende Menge von titrierter Alkalilauge zu. Die in kaltem Wasser ziemlich schwer lösliche Glutaminsäure scheidet sich dann bei genügender Konzentration kristallinisch ab. Um aus dem Filtrat von der salzsauren Glutaminsäure die Asparaginsäure und andere Aminosäuren zu gewinnen, verdampft man dasselbe, löst den Rückstand in Wasser und entfernt durch Kochen mit Bleioxyd in der bekannten Weise das Chlor. Die Reinigung der Glutaminsäure als Hydrochlorat setzt natürlich voraus, daß das Phenylalanin, dessen salzsaures Salz in überschüssiger Salzsäure schwer löslich ist, zuvor als Ester sorgfältig abgetrennt wurde. Ein bequemes Erkennungsmittel für Glutaminsäure ist ihr eigenartig fader und sehr schwach saurer Geschmack; der sichere Nachweis muß selbstverständlich durch die Elementar-Analyse der freien Säure oder des Hydrochlorates geführt werden. Bei größeren Mengen ist die quantitative Bestimmung der Glutaminsäure verhältnismäßig genau, da ihre Abscheidung als Hydrochlorat aus dem ursprünglichen Gemisch der Spaltungsprodukte gute Resultate liefert. Dagegen ist die Gewinnung aus dem Ester in quantitativer Beziehung recht unvollkommen. Erheblich besser wird übrigens die Ausbeute, wenn man den bei der Destillation der Ester bleibenden Rückstand mehrere Stunden mit Barytwasser kocht und in dem Filtrat nach Entfernung des Baryts die Glutaminsäure als Hydrochlorat abscheidet.

Serin.

Sein Ester findet sich vorzugsweise in den Fraktionen, die unter 0,5 mm Druck bei einer Temperatur des Bades von 100—130° übergehen. Seine Abscheidung mit Petroläther aus dem Estergemisch ist

oben erwähnt. Der rohe Ester enthält außer Serin auch wechselnde Mengen Asparagin- oder Glutamin-Säureester und außerdem noch Produkte unbekannter Zusammensetzung. Er wird durch $1^1/_2$-stündiges Erhitzen mit überschüssigem, konzentriertem Barytwasser auf dem Wasserbade verseift, dann der Baryt mit Schwefelsäure genau ausgefällt und das Filtrat unter vermindertem Druck verdampft. Beim Auskochen des Rückstandes mit absolutem Alkohol geht ein Teil der Verunreinigungen in Lösung, während das Serin im Rückstand bleibt. Man löst es in wenig Wasser, filtriert eventuell von dem schwer löslichen Rückstand, behandelt mit Tierkohle und überläßt dann die geklärte und eingedampfte Flüssigkeit der Kristallisation[1]). Das Präparat wird durch den Schmelz- und Zersetzungspunkt (gegen 245°) und die Elementar-Analyse identifiziert.

Will man noch ein Derivat darstellen, so empfiehlt es sich, die β-Naphtalinsulfo-Verbindung[2]) zu wählen. Das so gewonnene Serin ist optisch-inaktiv und identisch mit dem synthetischen Racemkörper. Ich vermute aber, daß die Aminosäure in den Proteïnen ursprünglich auch in der optisch-aktiven Form enthalten ist, und daß erst bei der Hydrolyse die Racemisierung eintritt. Vielleicht ist auch noch eine optisch-aktive Form unter den Spaltprodukten vorhanden, aber nicht so leicht zu kristallisieren, so daß sie sich bisher der Beobachtung hat entziehen können.

Ist die Menge des Serins verhältnismäßig klein, so können die beigemengten anderen Aminosäuren, insbesondere Asparagin- und Glutaminsäure, die Kristallisation verhindern. Dann wird die Abtrennung dieser Produkte durch das Kupfersalz und das Hydrochlorat notwendig, wie es bei der Isolierung des Serins aus dem Caseïn geschah. Bezüglich der Einzelheiten verweise ich auf die betreffende Abhandlung[3]).

Oxy-prolin (Oxy-Pyrrolidin-α-carbonsäure).

Ihre Abscheidung ist besonders mühsam und wurde deshalb bisher nur in wenigen Fällen (Gelatine, Caseïn, Oxyhaemoglobin, Edestin) durchgeführt. Sie beruht darauf, alle anderen Aminosäuren teils durch Kristallisation, teils durch die Estermethode, teils durch Fällung mit Phosphorwolframsäure zu entfernen. Aus den letzten Mutterlaugen kann dann das Oxy-prolin durch Kristallisation abgeschieden werden[4]). Zur Identifizierung empfiehlt sich die β-Naphtalin-sulfo-Verbindung[5]).

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 472 und 473 [1902]. (*S. 712 u. 713.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3784 [1902]. (*S. 201.*)
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 156 [1903]. (*S. 728.*)
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2660 [1902]. (*S. 680.*)
[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3785 [1902]. (*S. 202.*)

Tyrosin.

Seine Abscheidung nach der Hydrolyse des Proteïns mit Schwefelsäure ist oben erwähnt und bietet nichts neues. Ich glaube, bei dieser Gelegenheit betonen zu müssen, daß das rohe Tyrosin recht unrein sein kann, und daß die Darstellung des reinen Präparates keineswegs so leicht ist, wie man im allgemeinen annimmt.

Das öfters beigemengte Leucin entfernt man am besten nach dem von Habermann und Ehrenfeld[1]) angegebenen Verfahren durch Auskochen mit Eisessig; dabei scheinen auch noch andere Produkte entfernt zu werden. Aber auch dann noch ist in vielen Fällen wiederholtes Umlösen aus siedendem Wasser nötig, um ein analysenreines Präparat zu gewinnen.

Bei weitem am leichtesten gelingt die Darstellung des reinen Tyrosins aus Seide, weil diese nur sehr kleine Mengen anderer, in Wasser schwer löslicher Aminosäuren, wie Leucin, Phenylalanin, enthält. Es verdient aber bemerkt zu werden, daß selbst dieses Tyrosin in optischer Beziehung nicht ganz einheitlich ist, sondern kleine, aber wechselnde Mengen von Racemkörper enthält. Will man die Racemisierung des Tyrosins, oder allgemeiner gesprochen der Aminosäuren, ganz vermeiden, so muß die Hydrolyse des Proteïns durch Fermente ausgeführt werden, was aber leider bei der Seide bisher nicht möglich ist.

Diamino-trioxy-dodekansäure.

Mit diesem Namen haben Abderhalden und ich die Aminosäure $C_{12}H_{26}N_2O_5$ bezeichnet, die aus dem Caseïn entsteht und dem rohen Tyrosin beigemischt ist. Sie unterscheidet sich von dem Tyrosin durch die Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure. Nach dem Wasserstoffgehalt muß sie das Derivat einer gesättigten Fettsäure sein und die Gruppen enthalten, die in ihrem Namen angegeben sind. Im übrigen ist die Aufklärung ihrer Struktur, insbesondere die Zurückführung auf eine Fettsäure noch nicht durchgeführt. Wir mußten die Substanz für verschieden von der Caseïnsäure halten, die Skraup[2]) einige Monate vor unserer Publikation beschrieben hatte, weil sie nicht allein in der Zusammensetzung, sondern auch in den Eigenschaften von dem Skraupschen Präparate stark abwich. Inzwischen aber haben wir durch Privatkorrespondenz mit Herrn Skraup erfahren, daß seine Caseïnsäure bei sorgfältiger Reinigung so große Ähnlichkeit mit einem von uns gelieferten Präparate zeigte, daß sie wahrscheinlich identisch sind.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 18 [1902].

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1596 [1904].

Wenn wir trotzdem den von uns gewählten Namen beibehalten, so geschieht es, weil er die Zusammensetzung der Verbindung wiedergibt. Wir können zudem bemerken, daß unsere Untersuchung ganz unabhängig von der Skraupschen Arbeit war, und daß auch die Isolierungsmethode unseres Präparates mit dem Skraupschen Verfahren nicht die geringste Ähnlichkeit hat.

Die Aminosäure bildet ein schwer lösliches Kupfersalz, in welchem zwei Wasserstoffe durch das Metall ersetzt sind. Daß man daraus aber keineswegs auf ihre zweibasische Natur, oder mit anderen Worten auf die Anwesenheit von zwei Carboxylen schließen darf, beweist das gleiche Verhalten des Isoserins[1]).

Für die Isolierung der Aminosäure scheint mir unser Verfahren bequemer zu sein als das von Skraup angegebene.

Cystin und Diaminosäuren.

Bezüglich der Abscheidung des Cystins habe ich keine neuen Erfahrungen sammeln können. Ich verweise deshalb auf die ausführlichen Untersuchungen von K. A. Mörner[2]). Dasselbe gilt für die Diaminosäuren Arginin, Lysin und das Histidin, wo wir, dank den ausgezeichneten Untersuchungen von Drechsel, E. Schulze, Hedin und namentlich von A. Kossel, sogar recht gute quantitative Trennungsmethoden kennen.

Tryptophan.

ist durch die bekannten Farbreaktionen in den Proteïnen so leicht zu erkennen, daß es keiner neuen Proben bedarf. Ich habe mich deshalb nicht damit beschäftigt und verweise auf die schönen Untersuchungen von F. G. Hopkins und S. W. Cole (Journ. of Physiol. **27**, 418 und **29**, 451).

In neuerer Zeit sind einige weitere Aminosäuren von Skraup[3]) aus dem Caseïn und dem Leim erhalten worden. Ferner will Wohlgemuth[4]) in dem Rückstand der Ester, der bei der Hydrolyse eines Leberproteïds entstand, noch eine Aminosäure entdeckt haben. Bezüglich dieser Produkte fehlt mir jede Erfahrung, und ihre Beschreibung ist auch nicht der Art, daß man ihre Isolierung mit Sicherheit wiederholen könnte. Ich kann deshalb über die Tragweite und Zuverlässigkeit dieser Beobachtungen kein bestimmtes Urteil fällen.

---

[1]) E. Fischer und H. Leuchs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3795 [1902]. (*S. 256.*)

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**, 207 [1901].

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1596 [1904]; Monatsh. f. Chem. **25**, 633 [1904]; **26**, 1343 [1905].

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4362 [1904].

Ergebnisse der Estermethode.

Um den großen Nutzen der Estermethode zu beweisen, will ich die dadurch erzielten Resultate kurz zusammenstellen.

Neu entdeckt habe ich mit ihrer Hilfe als Spaltprodukt der Proteïne das Prolin, sowohl in der optisch-aktiven, als in der racemischen Form, von denen die letztere kurz vorher von Willstätter[1]) und dann von mir[2]) synthetisch erhalten war, ferner das Oxy-prolin. Dagegen ist ohne Benutzung der Ester die Diamino-trioxy-dodekansäure gefunden worden.

Viel größer aber sind die Dienste, welche die Methode für die Abscheidung der bekannten Aminosäuren geleistet hat. Während man in früherer Zeit sich gewöhnlich mit dem Nachweis des Tyrosins, Leucins und der Asparaginsäure begnügte und das Glykocoll oder die Glutaminsäure nur dann fand, wenn sie in relativ großer Menge zugegen waren, ist man jetzt imstande, die ganze, oben angeführte Reihe der Monoaminosäuren mit einem ziemlich hohen Grade von Sicherheit aufzufinden, falls nicht gerade ihre Menge verschwindend klein ist.

Im einzelnen sei noch hervorgehoben, daß Alanin und Serin, von denen das erste früher nur einmal mit Sicherheit im Seidenfibroïn und das zweite ebenfalls nur im Seidenleim gefunden war, jetzt als Bestandteile aller gewöhnlichen Proteïne erkannt sind und sogar das Glykocoll an Verbreitung weit übertreffen.

Dasselbe gilt für das Phenylalanin, welches von E. Schulze nur einmal als Spaltprodukt eines pflanzlichen Eiweißstoffes isoliert wurde, jetzt aber in allen darauf untersuchten Proteïnen nachgewiesen werden konnte; es ist sogar verbreiteter, als das ähnlich zusammengesetzte Tyrosin und steht diesem als aromatischer Bestandteil des Proteïnmoleküls an Bedeutung mindestens gleich.

Ebenso war die Auffindung der α-Amino-valeriansäure früher so außerordentlich schwierig, daß sie nur durch Zufall gelingen konnte. Durch die Estermethode ist auch diese Aufgabe wesentlich erleichtert. Endlich hat sie für das Glykocoll nicht allein eine sehr scharfe Erkennung, sondern auch eine in quantitativer Beziehung ziemlich befriedigende Abscheidung ermöglicht.

Das Bild, das wir durch diese Methode bezüglich der Verbreitung der Monoaminosäuren in den Proteïnen gewonnen haben, ist wesentlich verschieden von den früher gebräuchlichen Vorstellungen, und wenn auch die quantitativen Zahlen an Genauigkeit zu wünschen übrig

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 1160 [1900].
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 455 [1901]. (*S. 212.*)

lassen und meist hinter der Wirklichkeit zurückbleiben, so haben sie doch in relativer Beziehung eine nicht zu unterschätzende Bedeutung. Ich habe deshalb verschiedentlich daran Betrachtungen über den Zusammenhang der natürlichen Aminosäuren untereinander oder mit den Kohlenhydraten knüpfen können[1]), von denen ich die wesentlichsten Punkte hier wiederholen und vervollständigen will.

Das regelmäßige Vorkommen des Leucins, Alanins und Serins erklärt sich vielleicht durch die nahen Beziehungen in der Zusammensetzung mit den Kohlenhydraten. Das Molekül des Leucins hat dieselbe Kohlenstoffanzahl wie die Glucose, während Alanin und Serin die Hälfte davon enthalten, d. h. der Milchsäure bzw. der Glycerose entsprechen. Daß in dem Leucin die Kohlenstoffkette verzweigt ist im Gegensatz zu der normalen Kette der Glucose, kann nicht als Einwand gegen diese Betrachtung gelten, da bekanntlich, wie die Saccharinbildung beweist, bei den Kohlenhydraten aus der normalen Kohlenstoffkette leicht eine anormale entsteht.

Die α-Amino-valeriansäure steht meines Erachtens zu den Pentosen in dem gleichen Verhältnis wie das Leucin zu den Hexosen.

Phenylalanin und Tyrosin enthalten neben dem aromatischen Reste wiederum die aus drei Kohlenstoffatomen bestehende Gruppe. Cystin ist gerade so wie das Serin ein Alaninderivat.

Glutaminsäure und Asparaginsäure könnten durch Oxydation aus Aminovaleriansäure oder auch aus Leucin entstehen. Daß auch die Diaminosäuren Lysin und Arginin in diese Betrachtung verflochten werden können, ist selbstverständlich. Ich will aber hier erwähnen, daß bereits Kossel[2]) auf den möglichen Zusammenhang dieser Basen mit dem Leucin und den Kohlenhydraten hinwies und sie gerade deshalb Hexonbasen nannte. Am entferntesten steht scheinbar das Glykocoll, das übrigens auch in manchen, für den lebenden Organismus sehr wichtigen Proteïnen entweder gar nicht oder doch nur in untergeordneter Menge enthalten ist.

Besonders hervorzuheben ist noch die Rolle der Oxyaminosäuren, deren einfachster Repräsentant, das Serin, eine so weite Verbreitung hat. Nach meiner Überzeugung wird man von dieser Klasse noch andere Vertreter in den Eiweißkörpern auffinden; denn sie bilden eine natürliche Brücke zwischen den Kohlenhydraten und den einfachen Aminosäuren, wobei noch Zwischenprodukte wie das Glucosamin angenommen werden können.

---

[1]) Z. B. Fischer u. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 276 [1902]. (*S. 701.*)

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 175 [1898].

Ich bin mir wohl bewußt, daß derartige Betrachtungen der tatsächlichen Unterlage entbehren, halte sie aber doch nicht für nutzlos, weil sie anregend auf die experimentelle Forschung wirken können. Und daß die chemischen Übergänge zwischen den drei großen Klassen organischer Verbindungen: Kohlenhydrate, Eiweißstoffe und Fette reizvolle Probleme der physiologischen Chemie sind, bedarf keiner weiteren Ausführung. Ich will aber auch bei dieser Gelegenheit meine Ansicht nicht verschweigen, daß solche Spekulationen leicht über das Ziel hinausschießen, und daß die Literatur der letzten Jahre warnende Beispiele dafür genug gebracht hat.

Die Estermethode ist teils von mir, teils von meinen Mitarbeitern, namentlich von E. Abderhalden, auf so zahlreiche Proteïne angewandt worden, daß es mir lohnend erscheint, diese in folgender Tabelle zusammenzustellen. Die Reihenfolge ist chronologisch und die beigefügten Zitate beziehen sich sämtlich auf die Zeitschrift für physiologische Chemie.

Caseïn	(**33**, 151, *S. 633*; **35**, 227, *S. 690* und **39**, 155, *S. 728*; **42**, 540, *S. 736*).
Seidenfibroïn	(**33**, 177, *S. 654*; **35**, 221, *S. 686* und **39**, 155, *S. 730*).
Seidenleim	(**35**, 221, *S. 688*).
Eialbumin	(**33**, 412, *S. 667* und **46**, 24, *S. 755*).
Leim (Gelatine)	(**35**, 70, *S. 671* und **42**, 543, *S. 739*).
Horn	(**36**, 462, *S. 703*).
Oxyhämoglobin	(**36**, 268, *S. 695* und **37**, 484, *S. 740*).
Edestin	(**37**, 499, *S. 749*; **40**, 249, *S. 750* und **44**, 265, *S. 752* und 284, *S. 753*).
Serumalbumin	(**37**, 495, *S. 749*).
Zeïn	(**37**, 508).
Salmin	(**41**, 55, *S. 750*).
Thymushiston	(**41**, 278, *S. 750*).
Elastin	(**41**, 293, *S. 751*).
Gliadin	(**44**, 276, *S. 753*).
Serumglobulin	(**44**, 23, *S. 751*).
Ovomucoid	(**44**, 44, *S. 751*).
Eiweiß aus Kiefernsamen	(**45**, 273, *S. 754*).
Conglutin	(**45**, 479, *S. 754*).
Keratin aus Pferdehaaren und aus Gänsefedern	(**46**, 31, *S. 755* und **46**, 40, *S. 756*).
Bence-Jonesscher Eiweißkörper	(**46**, 125, *S. 756*).

Hydrolyse der Proteïne durch Alkalien oder Fermente.

Die Spaltung der Eiweißkörper durch Alkalien ist fast ebenso lange bekannt, wie die saure Hydrolyse. Den ausführlichsten Gebrauch davon hat Schützenberger gemacht, der zur Spaltung konzentriertes Barytwasser unter Druck bis zur Temperatur von 200° benutzte und dadurch sicherlich manche sekundäre Produkte erhalten hat.

Ich habe nur eine einzige Hydrolyse von Caseïn mit Kalilauge ausgeführt, speziell um zu beweisen, daß auch in alkalischer Lösung Prolin entsteht[1]). Die Hydrolyse geht hier langsamer vonstatten als mit Säure; denn beim Erhitzen von Caseïn mit der 5-fachen Menge 10-prozentiger Natronlauge auf 100° war die Biuretreaktion erst nach 65 Stunden nahezu verschwunden, und es konnte dann aus der Flüssigkeit eine nicht unbeträchtliche Menge von Prolin isoliert werden.

Ungleich wichtiger ist die Spaltung der Proteïne durch die Fermente des Verdauungstraktus. Eine größere Versuchsreihe über die Wirkung der Pankreasfermente[2]) allein oder die kombinierte Wirkung von Pepsin-Salzsäure und Pankreatin[3]) habe ich gemeinschaftlich mit E. Abderhalden ausgeführt.

Wurde die Verdauung im ersten Fall bis ungefähr zum Verschwinden der Biuretreaktion getrieben, so konnten unter den Spaltprodukten Prolin und Phenylalanin mit den jetzigen Methoden nicht nachgewiesen werden, während andere Monoaminosäuren, wie Alanin, Leucin, Glutaminsäure und Asparaginsäure, entstanden waren. Dagegen fand sich ein kompliziertes abiuretes Produkt, das mit den künstlichen Polypeptiden einige Ähnlichkeit zeigte und bei der Hydrolyse durch Salzsäure neben Alanin, Leucin, Glutamin- und Asparaginsäure auch reichliche Mengen von Prolin und Phenylalanin lieferte. Diese Beobachtungen erstrecken sich auf Caseïn, Edestin, Hämoglobin, Serumglobulin, Eieralbumin und Fibrin.

Bei successiver Pepsin- und Pankreatinverdauung konnten direkt unter den Spaltprodukten auch ziemlich große Mengen Prolin und Phenylalanin isoliert werden, während die Quantität des polypeptidartigen Stoffes geringer war. Wir haben daraus den Schluß gezogen, daß aller Wahrscheinlichkeit nach das Prolin ein wirklicher Bestandteil des Proteïnmoleküls ist, und daß ferner in Übereinstimmung mit den alten Ansichten von Kühne die Fermentverdauung nicht zur völligen Auflösung der Proteïne in die Aminosäuren führt; nur ist der resistente Teil kein gewöhnliches Pepton, wie Kühne angenommen

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 227 [1902]. (*S. 691.*)

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 81 [1903]. (*S. 717.*)

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **40**, 215 [1903]. (*S. 732.*)

hat, sondern ein abiuretes Produkt, das sich durch den Gehalt an Prolin und Phenylalanin auszeichnet.

Ob die Hydrolyse durch Säuren, Alkalien oder Fermente bewirkt wird, ist auf das Endresultat von keinem großen Einfluß. Die letzten Spaltprodukte sind die Aminosäuren, deren überwiegende Mehrzahl in allen drei Fällen entsteht. Eine Ausnahme bildet nur, soweit wir bis jetzt unterrichtet sind, das Tryptophan, das bei der Hydrolyse mit Säuren, wie es scheint, zum großen Teil zerstört wird. Ich halte es aber wohl für möglich, daß man noch andere leicht zerstörbare Spaltprodukte der Proteïne finden wird, die sich zwar bei der milden Wirkung der Fermente halten können, aber durch die starken Säuren und Alkalien zersetzt werden. Schon aus diesem Grunde scheint ein erneutes und gründlicheres Studium der fermentativen Hydrolyse sehr wünschenswert.

Da die Aminosäuren bisher die wichtigsten, in ihrer Struktur erkannten, hydrolytischen Produkte der Proteïne sind, so liegt die Frage, ob sie wirkliche Bestandteile des Proteïnmoleküls sind, sehr nahe und verdient nicht allein generell, sondern für jedes einzelne Produkt diskutiert zu werden. So viel mir aus der Literatur ersichtlich ist, neigen die meisten Forscher, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, zu der Ansicht, daß für die bei der fermentativen Hydrolyse entstehenden Aminosäuren das ursprüngliche Vorhandensein im Proteïnmolekül nicht zweifelhaft sein könne. Der einzige, der meines Wissens auch diese Ansicht verwirft und selbst bei der Spaltung durch Fermente komplizierte Atomverschiebungen im Eiweißmolekül annimmt, ist O. Löw[1]). Da aber seine Darlegung nur durch ganz unzutreffende Gründe gestützt ist, so glaube ich mich nicht weiter damit beschäftigen zu müssen.

Auch ich habe nicht den geringsten Zweifel, daß Tyrosin, Leucin Alanin, Tryptophan usw., die so leicht bei der pankreatischen Spaltung des Eiweiß entstehen, seine wirklichen Bestandteile sind, und die Gewinnung der künstlichen Polypeptide, sowie ihr Verhalten gegen Pankreassaft können als kräftige Stütze für diese alte und an und für sich schon sehr wahrscheinliche Ansicht gelten. Was aber für Tyrosin und Leucin zutrifft, das wird man füglicherweise auch für Glykocoll und Phenylalanin annehmen müssen, obschon sie bei der pankreatischen Verdauung entweder gar nicht oder nur in kleinen Mengen gefunden werden.

Aus den Erfahrungen mit den künstlichen Polypeptiden, die sich vom Glykocoll und Phenylalanin ableiten, kann man sogar den Schluß ziehen, daß auch manche natürliche Di- und Tripeptide dieser Aminosäuren aller Wahrscheinlichkeit nach gegen Pankreassaft widerstandsfähig sein werden.

---

[1]) Chemiker-Zeitung **1905**, Nr. 44, 604.

Schärfer aber hat sich die Frage zugespitzt bei dem Prolin und Oxy-prolin. Ich selbst habe sie gleich bei der Auffindung des ersteren als hydrolytisches Produkt der Proteïne aufgeworfen und die Möglichkeit betont, daß der Pyrrolidinring erst sekundär durch die Wirkung der Säure aus einer anderen labilen Gruppe entsteht[1]). Ich habe auch versucht, Arginin und Ornithin durch Kochen mit Säuren in Prolin überzuführen, aber ohne Erfolg. Als dann später auch bei der Hydrolyse des Caseïns mit Alkali Prolin gefunden war[2]), und als endlich durch die Versuche von Abderhalden und mir[3]) die Bildung derselben Aminosäure bei der kombinierten Verdauung durch Pepsinsalzsäure und Pankreatin beobachtet worden war, schien mir ihre sekundäre Entstehung höchst unwahrscheinlich. In letzter Zeit ist aber die Frage wiederum von S. P. L. Sörensen[4]) aufgerollt worden, nachdem er die interessante Beobachtung gemacht hatte, daß die von ihm synthetisch dargestellte α-Amino-δ-oxy-valeriansäure beim Abdampfen mit starker Salzsäure partiell in racemisches Prolin übergeht. So lange aber nicht die gleiche Umwandlung beim Erhitzen mit Alkalien oder bei successiver Wirkung von Pepsinsalzsäure und Pankreatin festgestellt und so lange außerdem die Amino-oxy-valeriansäure nicht selbst unter den Spaltprodukten des Eiweiß gefunden ist, sind die von mir für die primäre Natur des Prolins vorgebrachten Gründe nicht entkräftet. Ich halte es aber auch für sehr wohl möglich, daß Prolin und Amino-oxy-valeriansäure beide Bestandteile des Eiweiß sind, und daß sie entweder wechselseitig oder wenigstens das erste aus dem zweiten im Organismus entstehen. Aber selbst wenn sich herausstellen sollte, daß Prolin und Oxy-prolin nur sekundäre Produkte sind, so würde ihre Auffindung unter den Zersetzungsprodukten der Proteïne doch für die physiologische Chemie wichtig bleiben, weil man indirekt durch sie auf die primären Produkte aufmerksam geworden ist, und weil außerdem die Möglichkeit der Entstehung von Pyrrolidin-Derivaten aus den Proteïnen im Organismus bestehen bleibt.

Peptone und Albumosen.

Bekanntlich erfolgt der hydrolytische Abbau der Proteïne in verschiedenen Phasen, die namentlich für die fermentativen Prozesse Gegenstand ausführlicher Studien von seiten der physiologischen

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 169 [1901]. (*S. 648.*)

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 227 [1902]. (*S. 691.*)

[3]) Fischer und Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **40**, 215 [1903]. (*S. 732.*)

[4]) Trav. du Laborat. Carlsberg **6**, 137 [1905].

Chemiker gewesen sind. Aber bei aller Anerkennung, die ich den Arbeiten von Kühne, Hofmeister, Neumeister u. a. gern zolle, kann ich mich doch der Überzeugung nicht verschließen, daß die von ihnen angewandten Fällungsmethoden nicht imstande sind, bei so komplizierten Gemischen, wie sie durch den Zerfall der Proteïne entstehen, reine Produkte zu liefern, und daß deshalb die verschiedenen Sorten von Albumosen und Peptonen, mit denen die Physiologen rechnen, für den Chemiker nur unentwirrbare Gemische bedeuten können. Das nächste Ziel der Forschung auf diesem Gebiete müßte dahin gerichtet sein, aus ihnen chemisch definierbare, einheitliche Substanzen zu isolieren. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird das aber ohne die Auffindung neuer wirksamerer Trennungsmethoden nicht gelingen. Meine eigenen Erfahrungen auf diesem Gebiete sind noch sehr dürftig.

Abgesehen von den obenerwähnten Versuchen über die Verdauung des Caseïns, bei welcher der abiurete polypeptidartige Stoff aufgefunden wurde, habe ich mich, in Gemeinschaft mit P. Bergell[1]), eingehender nur mit der stufenweisen Hydrolyse des Fibroïns aus Seide beschäftigt und dabei, wie mir scheint zum erstenmal, eine Kombination der drei hydrolytischen Methoden, Spaltung durch Säuren, Basen und Fermente benutzt.

Das in allen indifferenten Lösungsmitteln unlösliche Fibroïn löst sich leicht in rauchender Salzsäure, und dabei entsteht nach den Beobachtungen von Weyl[2]) zuerst das sogenannte Sericoïn. Dies unterliegt dann der weiteren Hydrolyse und geht in ein peptonartiges Produkt über. Daraus konnten wir mit Pankreatin das Tyrosin völlig ausscheiden. Das jetzt entstandene Produkt zeigte auch noch die Reaktionen der Peptone. Beim Erwärmen mit Barytwasser verlor sich aber bald die für jene charakteristische Biuretreaktion, und aus dem nun resultierenden Präparat gelang es uns, durch Kristallisation und nachträgliche Darstellung der β-Naphtalinsulfo-Verbindung eine Substanz zu isolieren, die nach der Analyse und dem Resultat der Hydrolyse das Derivat eines Dipeptids aus Glykocoll und Alanin sein mußte.

Da aber seine Identifizierung mit den synthetisch dargestellten β-Naphtalinsulfo-Derivaten des Glycyl-*d*-alanins und des *d*-Alanylglycins mißlang[3]) und auch die Darstellung größerer Mengen des reinen Körpers auf Schwierigkeiten stieß, so blieb die Untersuchung länger, als ich erwartet hatte, unbeendet. In jüngster Zeit habe ich sie gemeinschaftlich mit E. Abderhalden wieder aufgenommen, und es ist

---

[1]) Vortrag zu Karlsbad 1902. Autoreferat in der Chemiker-Zeitung **1902**, Nr. 80. (*S. 621.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1407 [1888].

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2592 [1903]. (*S. 572.*)

uns mit Hilfe einer besseren Methode zur Trennung der Dipeptide von den höheren Peptiden und den Aminosäuren gelungen, in reichlicher Menge das Glycyl-*d*-alanin-Anhydrid abzuscheiden und dadurch die Anwesenheit von Glycyl-*d*-alanin unter den Spaltprodukten des Seidenfibroïns mit einem hohen Grade von Wahrscheinlichkeit darzutun[1]).

Ich hoffe, daß diese Beobachtung nicht vereinzelt bleiben, sondern den Anfang einer rationellen Bearbeitung jener komplizierten Gemische bilden wird.

Struktur und Systematik der Proteïne.

An Betrachtungen über die Konstitution der Eiweißkörper fehlt es in der chemischen und physiologischen Literatur nicht. Von bescheidenen Äußerungen über die Verkettung der Aminosäuren bis zu anspruchsvollen, höchst phantastischen Strukturformeln begegnet man allen Abstufungen. So weit ich mir ein Urteil habe bilden können, gehen die meisten Ansichten dahin, daß in den Proteïnmolekülen die Aminosäuren amidartig verkettet sind. Am ausführlichsten ist dieser Gedanke wohl von Hofmeister[2]) behandelt worden, aber er wird gewiß nicht den Anspruch erheben wollen, sein Urheber zu sein, denn alle synthetischen Versuche zur Verkupplung der Aminosäuren, unter anderem auch die Entdeckung des Glycyl-glycins[3]), die zeitlich vor seiner Publikation liegen, basieren auf der gleichen Annahme.

In der großen Ähnlichkeit der künstlichen Polypeptide mit den Peptonen, insbesondere bezüglich des Verhaltens gegen Pankreassaft, ferner in der Gewinnung des Glycyl-*d*-alanin-anhydrids aus Seide darf man eine neue, starke Stütze für jene Ansicht erblicken. Daß man mit dieser Art der Verkettung allein aus den bis jetzt bekannten natürlichen Aminosäuren schon eine recht stattliche Anzahl von Proteïnen theoretisch ableiten kann, liegt auf der Hand und ist von Hofmeister in populärer Form ausführlich gesagt worden. Besonders mannigfaltig wird natürlich das Bild durch die Beteiligung der Amino-dicarbonsäuren (Asparagin- und Glutaminsäure), sowie der Diaminosäuren (Lysin, Arginin usw.).

Ich möchte aber hier darauf aufmerksam machen, daß die einfache Amidbildung nicht die einzige Möglichkeit der Verkupplung im Proteïnmolekül ist. Im Gegenteil, ich halte es sogar für recht wahrscheinlich, daß einerseits Piperazinringe dort vorkommen, deren leichte Sprengung durch Alkali und Rückbildung aus den Dipeptiden oder

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **39**, 752 [1906]. (*S. 624.*)

[2]) Vortrag auf der Naturforscher-Versammlung zu Karlsbad 1902. (*S. 621.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2868 [1901]. (*S. 280.*)

ihren Estern ich so häufig bei den künstlichen Produkten beobachtet habe, und daß andererseits die zahlreichen Hydroxyle der Oxyaminosäuren keineswegs indifferente Gruppen im Proteïnmolekül sind. Die letzteren könnten durch intramolekulare Anhydridbildung in Ester- oder Äthergruppen übergehen, und die Mannigfaltigkeit würde sich noch erhöhen, wenn man Polyoxy-aminosäuren als wahrscheinliche Bestandteile des Eiweißes voraussetzt. Es liegt kein Grund vor, diese Betrachtung weiter auszuspinnen, aber es schien mir doch nötig, auf die verschiedenen Möglichkeiten hinzuweisen, um allzu einseitigen Anschauungen, die der experimentellen Forschung hinderlich werden können, vorzubeugen.

In dem Aufbau der Proteïne und ihrer verschiedenen komplizierten Derivate hat die Natur, soviel wir wissen, ihre höchste chemische Leistung erreicht, und es würde aller Erfahrung der organischen Chemie und der Biologie widersprechen, wenn sie sich hier auf nur wenige Typen beschränkt hätte.

Wie die große Zahl der Aminosäuren und ihr stetig wechselndes Mengenverhältnis schon zeigt, besteht in der Zusammensetzung der Proteïne eine ungleich größere Mannigfaltigkeit als bei den Kohlenhydraten und den Fetten. Wenn dazu nun noch die verschiedenen Möglichkeiten der Bindungsformen kommen, die ich oben angedeutet habe, so erhalten die Proteïne ein chemisches Gepräge, welches den überaus mannigfaltigen Zwecken ebenbürtig ist, zu denen sie von der Natur bei dem Aufbau und den Funktionen der Organe benutzt werden.

Was die Einteilung der Proteïne betrifft, so habe ich den Ausführungen in dem vor 4 Jahren gehaltenen[1]), trefflichen Vortrag des Herrn A. Kossel „Über den gegenwärtigen Stand der Eiweißchemie" nicht viel zuzufügen. Seine Ansicht, daß die chemische Systematik in erster Linie die bei der totalen Hydrolyse entstehenden Aminosäuren nach Qualität und Quantität berücksichtigen müsse, und daß man erst in viel späterer Zeit mit den Albumosen und Peptonen werde rechnen können, trifft auch jetzt noch zu. Nur ist die Zahl der Monoaminosäuren gewachsen und das Bild von ihrer Verbreitung durch die Resultate der Estermethode wesentlich anders geworden. Sieht man von den Protaminen ab, so übertreffen sie in den Eiweißkörpern an Masse bei weitem die Diaminosäuren, und in einzelnen Gerüstsubstanzen, wie dem Seidenfibroïn, bilden gerade die einfachsten unter ihnen, Glykocoll, Alanin, Serin und Tyrosin, die Hauptbestandteile.

Trotz des außerordentlich großen Interesses, welches das massenhafte Vorkommen der Diaminosäuren in den Protaminen für die Bio-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 3214 [1901].

logie hat, scheint mir deshalb Kossels Vorschlag, einen „Protaminkern“ in allen Eiweißkörpern anzunehmen und ihn zum Ausgangspunkt für die chemische Systematik zu machen, doch zu weit zu gehen. Die Möglichkeit, daß die geringen Mengen von Diaminosäuren in dem Seidenfibroin oder einzelnen pflanzlichen Eiweißstoffen nur Verunreinigungen sind, läßt sich nicht bestreiten; denn, wie Kossel selbst ganz richtig hervorgehoben hat, darf man bei den Proteïnen eine besonders große Neigung zur Bildung von Mischkristallen und sogenannten festen Lösungen annehmen. Aber selbst wenn die Diaminosäuren als Bestandteile des Moleküls gerechnet werden, so können sie doch in dem Riesenkomplex ganz anders verteilt sein, als in den Protaminen. Jedenfalls existiert bis jetzt keine Beobachtung, die das Gegenteil auch nur andeutet.

Die zuvor geschilderten Methoden zum Aufbau der Polypeptide sind so mannigfaltig, daß sie die Gewinnung von zahlreichen und recht komplizierten Kombinationen der natürlichen Aminosäuren gestatten werden, wenn man Arbeit und Kosten nicht scheut.

Aber die wahllose Vermehrung der Formen würde vielleicht die Mühe nicht lohnen. Wichtiger erscheint mir der Nutzen, den die Erfahrungen in der experimentellen Behandlung der synthetischen Produkte für die Auffindung neuer Methoden zur Abscheidung ihrer natürlichen Verwandten aus den Peptonen gewähren. Die Gewinnung des Glycin-*d*-alanin-anhydrids aus der Seide bietet das erste Beispiel dafür. Mir scheint deshalb die Hoffnung begründet, daß es in nicht allzu ferner Zeit gelingen wird, die wichtigsten Bestandteile der natürlichen Peptone und selbst der Albumosen zu isolieren und künstlich zu reproduzieren. Da es sich aber bei der sehr verschiedenen Zusammensetzung der Proteïne um eine große Anzahl von Einzelindividuen handelt, so wird schon hier die Arbeit vieler Hände nötig sein. Ungleich schwieriger gestaltet sich das Problem natürlich für die genuinen Eiweißkörper, denn für ihre Rekonstruktion aus den ersten Produkten der Hydrolyse müssen völlig neue Methoden geschaffen werden, und selbst wenn diese prinzipiell gegeben sind, wird ihre Anwendung in jedem Einzelfalle höchst wahrscheinlich eine langwierige Arbeit sein. Man kann sich deshalb die Frage vorlegen, ob der schließliche Erfolg der aufgewandten Mühe entsprechen wird. Das hängt meines Erachtens ab von dem Nutzen, den die biologische Forschung daraus ziehen kann, und dieser ist wieder bedingt durch die Art, wie die Synthese verwirklicht wird.

Wenn es heute durch einen glücklichen Zufall, mit Hilfe einer brutalen Reaktion, z. B. durch Zusammenschmelzen der Aminosäuren in Gegenwart eines wasserentziehenden Mittels, gelingen sollte, ein

echtes Proteïn darzustellen, und wenn es weiter möglich wäre, was noch unwahrscheinlicher ist, das künstliche Produkt mit einem natürlichen Körper zu identifizieren, so würde damit für die Chemie der Eiweißstoffe wenig und für die Biologie so gut wie gar nichts erreicht sein.

Eine derartige Synthese möchte ich einem Reisenden vergleichen, der im Schnellzug ein Land durcheilt und hinterher kaum etwas darüber berichten kann. Ganz anders gestaltet sich die Lage, wenn die Synthese gezwungen ist, schrittweise vorzugehen und das Molekül Stufe für Stufe aufzubauen, wie es oben für die Polypeptide gezeigt wurde. Dann gleicht sie dem Fußgänger, der Schritt für Schritt mit gespannter Aufmerksamkeit sich den Weg sucht, der viele Wege erproben muß, bis er den rechten gefunden hat. Der lernt auf seiner langen, mühsamen Wanderung nicht allein die Geographie und Topographie des Landes gründlich kennen, sondern wird auch mit der Sprache und Kultur seiner Bewohner vertraut. Wenn er schließlich sein Ziel erreicht hat, so ist er imstande, sich in jedem Winkel des Landes zurecht zu finden, und wenn er ein Buch darüber schreibt, so wird dies anderen Leuten auch möglich sein.

Ich möchte es deshalb geradezu als ein Glück ansehen, daß die Synthese genötigt ist, zahlreiche neue Methoden des Aufbaues, der Erkennung und Isolierung zu schaffen, und hunderte von Zwischenprodukten genau zu studieren, bevor sie zu den Proteïnen gelangen kann. Denn diese Methoden werden schließlich nicht allein dazu dienen, alle Proteïne der Natur und noch viel mehr, als sie hervorbrachte, zu erzeugen; sie werden voraussichtlich auch genügen für die Aufklärung der zahlreichen und merkwürdigen Umwandlungsprodukte von Proteïnen, die als Fermente, Toxine usw. eine so große Rolle spielen.

Kurzum, man darf erwarten, daß durch die tiefgehende und weit ausgedehnte synthetische Arbeit das ganze, jetzt noch so dunkle Gebiet chemisches Kulturland wird, aus dem die Biologie einen großen Teil der Hilfsmittel beziehen kann, deren sie zur Lösung ihrer chemischen Aufgaben bedarf.



II. Experimenteller Teil.



1. Emil Fischer: Über die Spaltung einiger racemischer Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **32**, 2451 (1899).
(Eingegangen am 14. August.)

Während durch die hydrolytische Spaltung von Proteïnstoffen in der Regel optisch-aktive Aminosäuren entstehen, sind die künstlichen Produkte bekanntlich zunächst racemisch. Die vollständige Synthese der natürlichen Verbindungen ist deshalb erst dann erreicht, wenn es auch gelingt, den Racemkörper in die optisch-aktiven Komponenten zu spalten. Das ist bisher nur in wenigen Fällen möglich gewesen. Am leichtesten gelingt die Darstellung der optisch-aktiven Asparagine; denn das synthetische Produkt zerfällt bei bloßer Kristallisation aus Wasser, und die hemiëdrisch ausgebildeten Kristalle sind groß genug, um mechanisch getrennt zu werden. Indirekt ist so auch die Synthese der beiden aktiven Asparaginsäuren ausgeführt. Die Möglichkeit einer gleichen Spaltung durch bloße Kristallisation wird für die racemische Glutaminsäure von Menozzi und Appiani[1]) angedeutet. Sie bemerken allerdings, die Menge der hemiëdrisch ausgebildeten Kristalle sei klein und deshalb die Trennung recht schwierig. Nach meinen Erfahrungen muß ich daran zweifeln, daß man auf diesem Wege die beiden aktiven Glutaminsäuren in irgendwie erheblichen Mengen darstellen kann. Es wäre deshalb wünschenswert, daß die Herren Menozzi und Appiani genauere Angaben über ihre Versuche machen wollten, damit man ersehen kann, ob es sich hier um eine praktisch ausführbare Methode handelt.

Zahlreicher sind die Versuche, die racemischen Aminosäuren durch partielle Vergärung optisch-aktiv zu machen. So entstehen nach Schulze und Boßhard[2]) aus dem racemischen Leucin und der racemischen Glutaminsäure durch die Wirkung von Penicillium glaucum die bis dahin unbekannten optischen Antipoden der aus den Eiweißkörpern dar-

[1]) Gazzetta chimica **24** (I), 378 u. 383 (1894).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **10**, 138 (1886).

stellbaren aktiven Säuren. Bei ihren Versuchen wurde die Vergärung so weit geführt, daß der zurückbleibende aktive Teil im reinen Zustand isoliert werden konnte. In ähnlicher Weise hat Engel[1]) den optischen Antipoden der gewöhnlichen Asparaginsäure aus dem Racemkörper gewonnen. Allerdings vermißt man in seiner Abhandlung die Angaben über den Pilz und über die quantitative optische Untersuchung des Produktes.

Die fruchtbarste Methode der Spaltung von Racemkörpern durch Kombination derselben mit anderen optisch-aktiven Substanzen ist bisher nicht mit Erfolg benutzt worden. Bei den einfachen Aminosäuren erklärt sich das leicht durch die geringe Verwandtschaft zu Basen und Säuren, welche die Kombination mit den Alkaloïden oder mit aktiven Säuren außerordentlich erschwert. Bei den Aminodicarbonsäuren, wie Asparaginsäure und Glutaminsäure, sind allerdings Salze mit den gewöhnlich gebrauchten, optisch-aktiven Basen darstellbar, und es liegen auch Angaben in der Literatur vor über Versuche, so eine Spaltung herbeizuführen, welche indessen resultatlos geblieben sind[2]). Es fehlt demnach bisher noch eine vollständige Synthese für die gewöhnliche aktive Glutaminsäure und das natürliche Leucin.

Ja bei dem Alanin, welches allerdings bisher nur einmal als Spaltungsprodukt von Proteïnstoffen beobachtet wurde, ist überhaupt noch keine optisch-aktive Form bekannt. Auch beim Tyrosin, welches mit zu den ältesten Aminosäuren gehört, hat die Synthese nur bis zu dem Racemkörper geführt, und selbst die Existenz der dem gewöhnlichen Tyrosin optisch entgegengesetzten *d*-Verbindung ist noch zweifelhaft, da die partielle Vergärung des Racemkörpers nicht ausgeführt und ein rechtsdrehendes Tyrosin nur einmal von E. von Lippmann[3]) in Rübenschößlingen beobachtet, aber nur sehr wenig untersucht wurde.

Wegen des physiologischen Interesses, welches die obenerwähnten optisch-aktiven Aminosäuren besitzen, schien mir ihre Bereitung aus den synthetischen Racemkörpern auf chemischem Wege wünschenswert. Das Mittel dazu hat sich gefunden in ihren Benzoylderivaten. Dieselben sind stärkere Säuren, als die ursprünglichen Aminoverbindungen und bilden infolgedessen mit den Alkaloïden beständige Salze. Sie sind ferner meistens in Wasser schwerer löslich und lassen sich infolgedessen leichter isolieren; durch den Einfluß des Benzoyls wird auch das Kristallisationsvermögen der Salze erhöht. Endlich können diese Benzoylverbindungen wieder in die ursprünglichen Aminokörper zu-

---

[1]) Bull. de la société chimique **50**, 152.

[2]) Z. B. für Glutaminsäure, Gazz. chim. **24** (I), 378.

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 2839.

rückverwandelt werden. Diese Umstände zusammengenommen haben es ermöglicht, das racemische Alanin, die Asparaginsäure und die Glutaminsäure in die optisch-aktiven Komponenten zu zerlegen.

Als aktive Basen haben sich wieder Strychnin und Brucin, welche ich in der Zuckergruppe für diesen Zweck zuerst benutzte, besonders bewährt.

So wird aus dem racemischen Benzoylalanin schon durch zweimalige Kristallisation des Brucinsalzes aus Wasser eine aktive Form in reinem Zustande gewonnen, welche ich *l*-Benzoylalanin nenne. Die entsprechende *d*-Verbindung wurde aus den Mutterlaugen durch Darstellung des Strychninsalzes rein erhalten. Aus den beiden Benzoylverbindungen lassen sich dann durch Spaltung mit Salzsäure die beiden aktiven Alanine darstellen. In salzsaurer Lösung drehen dieselben recht erheblich, dagegen ist das Drehungsvermögen der freien Aminosäuren so schwach, daß es bei verdünnten Lösungen leicht übersehen wird. Wegen dieser Eigenschaft sind die optisch-aktiven Alanine wahrscheinlich bisher der Beobachtung entgangen. Denn ich zweifle nicht daran, daß man schon versucht hat, durch Pilzgärung das so leicht zugängliche, racemische Alanin zu spalten, was in der Tat, wie ich später zeigen werde, möglich zu sein scheint. Ebenso glaube ich, daß das Alanin, welches Weyl[1]) aus Seide durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure gewonnen hat, trotz der scheinbaren Inaktivität in Wirklichkeit doch eine von den beiden optisch-aktiven Modifikationen gewesen ist. Ich werde übrigens diese Vermutung noch experimentell prüfen.

Die racemische Benzoylasparaginsäure läßt sich durch Brucin allein vollständig in die Komponenten trennen, da bei der einen Form das neutrale Salz, bei der anderen das saure schwerer löslich ist. Aus den Benzoylverbindungen wurden dann die beiden aktiven Asparaginsäuren durch Kochen mit Salzsäure im reinen Zustand gewonnen.

Bei der racemischen Benzoylglutaminsäure ist weder das saure, noch das neutrale Brucinsalz trotz des großen Kristallisationsvermögens für die Spaltung brauchbar. Dagegen gelingt dieselbe mit dem neutralen Strychninsalz. Diese Methode gibt die Benzoyl-*l*-glutaminsäure und weiterhin die *l*-Glutaminsäure in ganz reinem Zustand. Die Benzoyl-*d*-glutaminsäure ließ sich aus den Mutterlaugen fast rein isolieren, weil sie von der gleichzeitig vorhandenen racemischen Verbindung durch ihre viel größere Löslichkeit in Wasser und ihre geringere Neigung zu kristallisieren getrennt werden kann. Ihre Spaltung gab dann die natürliche *d*-Glutaminsäure, welche durch Umkristallisieren aus starker Salz-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1530.

säure völlig gereinigt werden kann, und deren totale Synthese dadurch ermöglicht wird.

Für diese Versuche bedurfte ich größerer Mengen der Benzoylaminosäuren, welche keineswegs leicht zugänglich und von denen die Derivate der Asparagin- und Glutaminsäure nicht einmal bekannt sind. Der Grund dafür ist die Unvollkommenheit der bisher für die Benzoylierung von Aminosäuren benutzten Methoden. Das bekannte Schotten-Baumannsche Verfahren, welches von Baum auf diese Körperklasse zuerst übertragen wurde, gibt beim Glykocoll noch ganz gute Resultate; dagegen läßt die Ausbeute beim Alanin schon zu wünschen übrig, und bei der Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure erhält man durch Behandlung mit Benzoylchlorid in wässeriger Lösung bei Abwesenheit oder Anwesenheit von Alkali, Pyridin oder ähnlichen Basen nur ganz kleine Mengen der Benzoylkörper.

Ausgezeichnet werden dagegen die Resultate, wenn man in wässeriger Lösung bei Gegenwart von viel Natriumbicarbonat mit einem erheblichen Überschuß von Benzoylchlorid operiert. Das Verfahren hat sich auch bei dem Alanin, Leucin und Tyrosin[1]) bewährt. Es scheint deshalb allgemeiner brauchbar zu sein und wird voraussichtlich auch gute Dienste bei der Aufsuchung neuer Aminosäuren leisten.

Von befreundeter Seite wurde ich nachträglich darauf aufmerksam gemacht, daß in dem Lehrbuch von Meyer-Jacobson (Bd. II, S. 546) nach einer Privatmitteilung des Herrn Bamberger für die Benzoylierung von alkaliempfindlichen Körpern die Anwendung von Natriumbicarbonat bereits empfohlen worden ist. Man erkennt aber leicht, daß es sich hier, wo die Produkte gegen Alkali beständig sind, um einen ganz anderen, wie es scheint, spezifischen Einfluß des Bicarbonats handelt.

Spaltung des racemischen Benzoylalanins.

Für die Bereitung des Benzoylalanins wurde zuerst das Verfahren von Baum[2]), Schütteln einer schwach alkalischen Lösung von Alanin mit Benzoylchlorid, angewandt. Da aber die Ausbeuten stark schwankten und immer erheblich hinter der Theorie zurückblieben (die höchste Ausbeute an Rohprodukt betrug 70 % der Theorie, in anderen Fällen

---

[1]) Die Derivate des Leucins und Tyrosins sind in dieser Abhandlung nicht weiter erwähnt, sollen aber später genauer beschrieben werden. Das erstere, aus käuflichem Leucin dargestellt, ist das Monobenzoylderivat, es kristallisiert aus einer Mischung von Äther und Ligroïn in schönen Prismen vom Schmp. 126—128°. Dagegen gab das aktive Tyrosin ein Dibenzoylprodukt, welches aus Eisessig in farblosen Nadeln vom Schmp. 210—211° kristallisiert.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**, 465.

wurden nur 30 % erhalten), so wurde schließlich an Stelle des Alkalis Natriumbicarbonat verwendet und dabei ein recht gutes Resultat erzielt.

3 g Alanin wurden in 30 ccm Wasser gelöst, dann 22 g gepulvertes Bicarbonat und in kleinen Portionen 14,5 g Benzoylchlorid (3 Mol.) hinzugegeben und bei Zimmertemperatur tüchtig geschüttelt. Nach ca. 1 Stunde war das Benzoylchlorid verschwunden, und als die filtrierte Flüssigkeit mit Salzsäure übersättigt wurde, schied sich ein dicker Kristallbrei ab, welcher aus Benzoësäure und Benzoylalanin bestand. Derselbe wurde nach längerem Stehen filtriert, gewaschen, getrocknet und zur Entfernung der Benzoësäure wiederholt mit Ligroïn ausgekocht. Die Ausbeute an rohem Benzoylalanin betrug 6 g, während 6,15 g berechnet sind. Einmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser gab 4,5 g reines Präparat. Der Schmelzpunkt wurde, wie von Baum angegeben, bei 162—163° (korr. 165—166°) gefunden.

Der Versuch läßt sich ebenso leicht in größerem Maßstabe ausführen.

l-Benzoylalanin.

Zur Abscheidung des linksdrehenden Benzoylalanins ist, wie schon erwähnt, das Brucinsalz besonders geeignet. Zur Darstellung desselben werden 65 g racemisches Produkt mit 157 g kristallwasserhaltigem Brucin in 240 ccm Wasser heiß gelöst. Aus der kalt gewordenen Flüssigkeit scheidet sich im Laufe von 15 Stunden bei 0° ein Brucinsalz in harten Krusten ab, welche aus rosettenförmig gruppierten, flachen Prismen oder Tafeln bestehen. Dasselbe wurde zur Reinigung zweimal aus je 100 ccm Wasser umkristallisiert und jedesmal erst nach 12-stündigem Stehen im Eisschrank filtriert. Die Ausbeute betrug dann noch 84 g trockenes Salz, während 99 g berechnet sind, und das Produkt bestand aus zentimeterlangen, meist zugespitzten Tafeln, welche größtenteils kugel- oder rosettenförmig gruppiert waren. Analysiert wurde es nicht.

Zur Wiedergewinnung des Benzoylalanins löst man 20 g des Salzes in 60 ccm heißem Wasser, fügt 35 ccm Normalkalilauge hinzu, wodurch bald das Brucin ausgefällt wird, kühlt zur möglichsten Abscheidung desselben auf 0° ab und filtriert auf der Pumpe. Die Mutterlauge wird mit 35 ccm Normalsalzsäure angesäuert, unter vermindertem Druck bei 40—50° stark eingedampft und abgekühlt. Dabei fällt das aktive Benzoylalanin zunächst als Öl aus, welches aber bald kristallinisch erstarrt. 20 g Brucinsalz lieferten 4,8 g dieses Produktes. Durch einmaliges Umkristallisieren aus der fünffachen Menge heißem Wasser erhält man dasselbe ganz rein. Es kristallisiert aus Wasser in schönen, glänzenden Platten, welche häufig die Form eines Dachgiebels haben.

Es schmilzt glatt bei 147—148° (korr. 150—151°), also erheblich niedriger, als das inaktive Alanin, welches mithin eine wahre racemische Verbindung ist. Die an der Luft getrocknete Substanz verlor bei 100° nicht mehr an Gewicht.

0,2018 g Sbst.: 0,4592 g CO_2, 0,1031 g H_2O.

$C_{10}H_{11}NO_3$. Ber. C 62,18, H 5,7.

Gef. „ 62,06, „ 5,68.

Die Substanz löst sich bei 20° in 85 Teilen Wasser (für die Herstellung der Lösung wurde die fein gepulverte Substanz 6 Stunden mit Wasser geschüttelt). Eine Lösung, welche 0,99 % enthielt, drehte bei 20° im 4-Dezimeterrohr das Natriumlicht 0,13° nach links, so daß $[\alpha]_D^{20} = -3,3°$.

Wegen der geringen Löslichkeit der Säure wurde für die genaue optische Bestimmung die alkalische Lösung gewählt.

1,5 g Substanz wurden in 7,8 ccm Normalkalilauge (berechnet 7,77 ccm) und ca. 5,7 ccm Wasser gelöst. Das Gesamtgewicht der Flüssigkeit betrug 15,145 g, das spezifische Gewicht 1,0427, der Prozentgehalt an Benzoylalanin 9,904 und die Drehung bei 20° im 2-Dezimeterrohr bei Natriumlicht 7,7° nach links. Mithin beträgt für *l*-Benzoylalanin in wässerig-alkalischer Lösung die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = -37,3°$.

Um zu prüfen, ob das untersuchte Benzoylalanin schon ganz frei von racemischer Verbindung sei, wurde eine andere Menge des Brucinsalzes doppelt so oft aus Wasser umkristallisiert. Das daraus isolierte Benzoylalanin zeigte denselben, oben angegebenen Schmelzpunkt, und die optische Bestimmung gab für die alkalische Lösung $[\alpha]_D^{20} = -37,4°$.

Das Benzoylalanin ist der Hippursäure recht ähnlich. Von den Salzen hat die Silberverbindung besonders schöne Eigenschaften. Sie fällt als kristallinischer Niederschlag aus, wenn die neutrale Lösung des Benzoylalaninammoniaks mit Silbernitrat versetzt wird, und läßt sich auch durch Kochen der Säure mit Silberoxyd in wässeriger Lösung darstellen. Sie ist selbst in heißem Wasser ziemlich schwer löslich und färbt sich beim längeren Stehen am Licht langsam dunkel.

l-Alanin.

Die hydrolytische Spaltung des Benzoylalanins durch Säuren geht ziemlich langsam vonstatten. Als 5 g der Verbindung mit 25 ccm Salzsäure von 20 % 5 Stunden auf 100° erhitzt wurden, war die Reaktion noch nicht ganz beendet. Beim Erkalten schied sich ein dicker Brei von Benzoësäure ab, welcher ausgeäthert wurde. Dabei geht auch das

unveränderte Benzoylalanin mit in den Äther über; es läßt sich leicht isolieren, indem man den Äther verdampft und den Rückstand mit Ligroïn auskocht, wobei nur die Benzoësäure gelöst wird. Die Menge des zurückgewonnenen Benzoylalanins betrug hier 1 g. Die salzsaure Lösung enthält nach dem Ausäthern das *l*-Alanin, dessen Hydrochlorat beim Verdampfen als farblose, kristallinische Masse zurückbleibt. Dasselbe wurde zur völligen Reinigung in nicht zuviel warmem, absolutem Alkohol gelöst und nach Zusatz von einigen Tropfen alkoholischer Salzsäure durch allmählichen Zusatz von Äther wieder abgeschieden. Es fiel dabei in sehr feinen, farblosen Nadeln aus, welche im Vakuum getrocknet, bei 100° nicht mehr an Gewicht verloren und den der Formel $C_3H_7NO_2$, HCl entsprechenden Chlorgehalt zeigten.

0,2343 g Sbst.: 0,2655 g AgCl.

$C_3H_7NO_2$, HCl. Ber. Cl 28,29. Gef. Cl 28,03.

Das Salz ist in Wasser sehr leicht löslich und dreht das polarisierte Licht nach links.

Angewandt 1,0248 g Substanz; das Gesamtgewicht der Lösung betrug 11,0198 g, das spez. Gewicht 1,0278, der Prozentgehalt an Alaninchlorhydrat 9,2996 und die Drehung bei 20° im 2 dcm-Rohr bei Natriumlicht 1,85° nach links. Daraus berechnet sich die spez. Drehung $[\alpha]_D^{20°} = -9,68°$.[1])

Zur Darstellung der freien Aminosäure ist die Zerlegung des Hydrochlorats mit Silberoxyd nicht zu empfehlen. Bessere Resultate gibt gefälltes Bleioxyd oder Bleihydroxyd. Zu dem Zweck wird das Hydrochlorat in ca. 30 Teilen Wasser gelöst und mit einem Überschuß von Bleioxyd, welches durch Eingießen einer Bleiacetatlösung in warme Barytlösung dargestellt ist, 15 Minuten gekocht, bis eine Probe des Filtrats kaum noch eine Chlorreaktion liefert. Die filtrierte Lösung wird dann mit Schwefelwasserstoff entbleit und verdampft, wobei das *l*-Alanin als fast farblose, kristallinische Masse zurückbleibt. Die Ausbeute ist, auf das Hydrochlorat berechnet, fast quantitativ. Zur völligen Reinigung wird das Präparat in der fünffachen Menge Wasser gelöst und in der Hitze Alkohol bis zur beginnenden Kristallisation hinzugefügt. Beim Erkalten fällt dann das *l*-Alanin in farblosen Stäbchen oder dünnen Prismen aus, welche, im Exsikkator getrocknet, wasserfrei sind und folgende Zahlen gaben:

0,1796 g Sbst.: 0,2658 g CO_2, 0,1252 g H_2O.

$C_3H_7NO_2$. Ber. C 40,45, H 7,86. Gef. C 40,36, H 7,75.

Das *l*-Alanin zersetzt sich beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 297° unter stürmischer Gasentwickelung, unterscheidet sich also

[1]) *Vgl. S. 561.*

in dieser Beziehung nicht viel von der racemischen Verbindung, die sich an demselben Thermometer bei 293° zersetzte. Es löst sich sehr leicht in heißem Wasser und kristallisiert daraus bei genügender Konzentration in der Kälte. Es löst beim Kochen gefälltes Kupferoxyd in reichlicher Menge mit blauer Farbe auf.

Das Drehungsvermögen des *l*-Alanins ist sehr gering. Eine wässerige Lösung, die 8,8% Alanin enthielt, drehte bei Natriumlicht im 1 dcm-Rohr ca. 0,21° nach links. Bei Anwendung von violettem Licht drehte dieselbe Lösung ca. 0,44° nach links.

Durch Benzoylchlorid wird die Verbindung bei Gegenwart von Natriumbicarbonat glatt in das *l*-Benzoylalanin zurückverwandelt, dessen Reinheit durch die Bestimmung der spezifischen Drehung in alkalischer Lösung (gef. 36,8°) kontrolliert wurde.

d-Benzoylalanin.

Dasselbe befindet sich in der Mutterlauge, welche das *l*-Benzoylalanin als Brucinsalz abgeschieden hat. Zu seiner Gewinnung wurde die aus dem obigen Versuch mit 65 g racemischem Benzoylalanin resultierende erste Mutterlauge mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt, dann zur Fällung des Brucins mit 250 ccm Normalkalilauge versetzt, abgekühlt, filtriert und die Lösung mit 250 ccm Normalsalzsäure angesäuert. Aus der klaren Flüssigkeit schieden sich im Lauf von 15 Stunden 9 g große, schwach gelb gefärbte Prismen ab, welche zum größten Teil aus racemischem Benzoylalanin bestanden. Die Mutterlauge gab, nachdem sie durch Verdampfen im Vakuum stark konzentriert war, noch 18 g eines kristallisierten Produktes, welches nach der optischen Untersuchung einer Probe aus ca. 90% *d*-Benzoylalanin und 10% racemischer Verbindung bestand. Durch Umkristallisieren aus Wasser läßt sich die letztere Beimengung nicht gut entfernen, weil sie schwerer löslich ist, als die aktive Form. Man gelangt deshalb rascher zum Ziel durch Verwandlung in das Strychninsalz.

Zu dem Zweck wurden 13,3 g von dem erwähnten Produkt mit 23 g Strychnin in 300 ccm heißem Wasser gelöst. Beim mehrstündigen Stehen in der Kälte schieden sich schöne, dicke Tafeln oder flache Prismen aus, welche öfters an Briefkuverts erinnerten. Dieselben wurden noch viermal aus je 300 ccm Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug dann zuletzt 20,5 g. Das reine Salz fällt aus der konzentrierten Lösung in großen Tafeln, welche meist zu dicken Aggregaten verwachsen sind. Aus der verdünnten Lösung kristallisieren dagegen beim mehrtägigen Stehen glänzende, schön ausgebildete, dicke Platten oder auch Prismen.

Zur Umwandlung in das *d*-Benzoylalanin wurden 20 g des Salzes in 600 ccm Wasser gelöst, mit 40 ccm Normal-Kalilauge zerlegt, abgekühlt, filtriert und die Mutterlauge mit 40 ccm Normal-Salzsäure angesäuert. Die im Vakuum stark konzentrierte Flüssigkeit schied dann beim Abkühlen das reine *d*-Benzoylalanin ab. Die Ausbeute betrug 5,2 g. Der relativ große Verlust ist hauptsächlich durch das häufige Umkristallisieren des Strychninsalzes bedingt.

Die Substanz schmilzt genau so wie die *l*-Verbindung bei 147—148⁰ (korr. 150—151⁰), und die optische Bestimmung gab folgendes Resultat:

Eine Lösung vom Gewicht 11,199 g, welche 1,0312 g Substanz mit der für 1 Mol. berechneten Menge Kaliumhydroxyd enthielt und das spez. Gewicht 1,0397 hatte, drehte im 2 dcm-Rohr bei 20⁰ das Natriumlicht 7,11⁰ nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20^0} = +37{,}13^0$, während bei dem *l*-Benzoylalanin unter denselben Bedingungen —37,4⁰ gefunden wurde.

d-Alanin.

Dasselbe wird durch Spaltung des Benzoylderivats genau in derselben Weise wie die *l*-Verbindung gewonnen. Die optische Bestimmung des salzsauren Salzes gab folgendes Resultat:

Eine Lösung von 7,4963 g, welche 0,644 g Chlorhydrat (bei 100⁰ getrocknet) enthielt und das spez. Gewicht 1,0242 hatte, drehte bei 20⁰ im 1 dcm-Rohr das Natriumlicht 0,84⁰ nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20^0} = +9{,}55^0$, während bei der *l*-Verbindung —9,68⁰ gefunden wurde.[1])

Sowohl das salzsaure Salz wie die freie Aminosäure sind, abgesehen von dem optischen Verhalten, den *l*-Verbindungen ganz gleich.

Versuch, das *dl*-Alanin durch Schimmelpilze zu spalten.

Penicillium glaucum wächst auf einer 2-prozentigen Alaninlösung, welche mit Nährsalzen versetzt ist, recht schlecht. Etwas besser entwickelt sich Aspergillus niger, und dabei findet eine partielle Vergärung statt, wie folgende Beobachtung zeigt:

1 g *dl*-Alanin wurde in 50 ccm Wasser gelöst, dazu 1 ccm einer Salzlösung zugegeben, die in 100 ccm 0,1 g Kaliumphosphat und 0,02 g Magnesiumsulfat enthielt. Als die sterilisierte Lösung mit Sporen von Aspergillus niger geimpft worden war und bei 33⁰ im Brutschrank stehen blieb, begann schon nach einem Tage die Mycelbildung. Nach 15 Tagen war eine ziemlich starke Pilzdecke mit reichlicher Conidienbildung entstanden. Die bräunlich gefärbte Flüssigkeit wurde jetzt filtriert, mit Tierkohle entfärbt und eingedampft. Der Rückstand betrug 0,9 g, so

[1]) *Vgl. S. 561.*

daß nur ein kleiner Teil des Alanins vergoren war. Dieses Produkt, mit der berechneten Menge Salzsäure und Wasser zu 4 ccm gelöst, drehte im 1 dcm-Rohr 0,15° nach links. Offenbar war also ein Teil des *d*-Alanins durch den Pilz verzehrt, aber die Spaltung blieb doch sehr unvollkommen, denn sie entsprach nur etwa 10% des Racemkörpers. Die Aussicht, auf diesem Wege reines *l*-Alanin zu gewinnen, ist also nicht sehr groß, und die zuvor beschriebene chemische Methode dürfte deshalb den Vorzug verdienen.

Benzoylierung der *l*-Asparaginsäure.

Beim Schütteln einer Lösung von Asparaginsäure in Natronlauge oder Pyridin mit Benzoylchlorid ließ sich kein Benzoylderivat erhalten. Besser war das Resultat, als die wässerige Lösung der Säure zur Anwendung kam; nur ist man hier genötigt, bei starker Verdünnung zu arbeiten, und die Ausbeute läßt auch noch viel zu wünschen übrig. Sehr befriedigend war letztere bei Zusatz von Bicarbonat.

Man suspendiert 15 g käufliche Asparaginsäure in 250 ccm Wasser, setzt 83 g Natriumbicarbonat hinzu und trägt dann unter dauerndem kräftigem Schütteln allmählich 45 g Benzoylchlorid ein. Unter Kohlensäureentwickelung geht dasselbe in Lösung, und die Reaktion kann in $^3/_4$—1 Stunde zu Ende geführt werden. Die schwach getrübte Flüssigkeit wird jetzt filtriert, mit 90 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 versetzt und der Niederschlag nach einigem Stehen in Eiswasser filtriert, getrocknet und dann zur Entfernung der Benzoësäure wiederholt mit Ligroïn ausgekocht. Die zurückbleibende Benzoylasparaginsäure wird aus heißem Wasser umkristallisiert. An der Luft getrocknet, ist die Substanz wasserfrei, wodurch sie sich von der gleich zu beschreibenden racemischen Verbindung scharf unterscheidet.

0,2018 g Sbst.: 0,4132 g CO_2, 0,0878 g H_2O.

$C_{11}H_{11}NO_5$. Ber. C 55,70, H 4,64.
Gef. „ 55,84, „ 4,83.

Sie löst sich in etwa 3—4 Teilen heißem Wasser und in 261 Teilen Wasser von 20°. Aus warmem Wasser kristallisiert sie in Nadeln oder langen, schmalen Blättchen und schmilzt bei 180—181° (korr. 184 bis 185°) ohne Zersetzung.

In alkalischer Lösung dreht sie das polarisierte Licht nach rechts. Für die quantitative Bestimmung diente eine Lösung, welche mit der für 2 Mol. KOH berechneten Menge Normalkalilauge und Wasser hergestellt war, 9,0167% Benzoyl-*l*-Asparaginsäure enthielt und das spez. Gewicht 1,0592 besaß. Die Drehung betrug bei 20° im 2-Dezimeterrohr

bei Natriumlicht 7,15° nach rechts. Daraus berechnet sich für Benzoyl-*l*-Asparaginsäure bei Gegenwart von 2 Mol. KOH $[\alpha]_D^{20} = +37,4^0$. Merkwürdigerweise ist diese Zahl ebenso groß, wie bei dem aktiven Benzoylalanin.

dl-Benzoylasparaginsäure. Für ihre Bereitung benutzte ich inaktive Asparaginsäure, welche nach der Vorschrift von Michael und Wing[1]) dargestellt war. Das Verfahren war das gleiche wie bei der aktiven Verbindung. Die Ausbeute an Benzoylprodukt betrug vor dem Umkristallisieren aus Wasser 85% der Theorie. Für die Analyse wurde dasselbe zweimal aus Wasser umkristallisiert. Die so erhaltenen, glänzenden, farblosen Platten, welche meist zu dicht verwachsenen Aggregaten vereinigt sind, enthalten im lufttrocknen Zustand 1 Mol. Kristallwasser, welches beim zweistündigen Erhitzen auf 110° völlig entweicht.

0,8718 g Sbst.: verloren 0,0644 g H_2O.

$C_{11}H_{11}NO_5 + H_2O$. Ber. H_2O 7,06. Gef. H_2O 7,39.

Die wasserfreie Substanz gab folgende Zahlen:

0,2360 g Sbst.: 0,4816 g CO_2, 0,0980 g H_2O.

$C_{11}H_{11}NO_5$. Ber. C 55,70, H 4,64.
Gef. „ 55,65, „ 4,61.

Das trockne Produkt schmilzt bei 161—162° (korr. 164—165°) ohne Zersetzung. Es löst sich in 3—4 Teilen heißem Wasser. Für die Löslichkeit in kaltem Wasser hat man zu unterscheiden zwischen der trocknen und der kristallwasserhaltigen Säure. Die letztere verlangt zur Lösung 664 Teile Wasser von 20° (die Lösung wurde durch sechsstündiges Schütteln der fein gepulverten Substanz mit Wasser dargestellt). Die trockne Säure ist dagegen viel leichter löslich, Schüttelt man deshalb die gepulverte, trockne Substanz mit etwa 200 Teilen Wasser, so entsteht zunächst eine klare Lösung, dann aber erfolgt sehr bald die Kristallisation der wasserhaltigen Verbindung. Die im Vergleich zu der aktiven Substanz geringe Löslichkeit in Wasser sowie der Wassergehalt der Kristalle beweisen, daß die Substanz eine wahre racemische Verbindung und kein mechanisches Gemisch der beiden optischen Formen ist.

Zerlegung der racemischen Benzoylasparaginsäure in die optisch-aktiven Komponenten.

Dieselbe läßt sich ebenfalls mit Brucin ausführen und liefert sogar beide optischen Isomeren im reinen Zustand. Denn die Benzoylasparaginsäure bildet mit der Base ein neutrales und ein saures Salz, von

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 2984.

welchen das eine bei der *l*-Verbindung und das andere bei der *d*-Verbindung schwerer löslich ist.

20 g wasserhaltige *dl*-Benzoylasparaginsäure werden mit 78 g Brucin (2 Mol.) in 200 ccm Wasser heiß gelöst. Beim 12—15-stündigen Stehen der abgekühlten Lösung scheiden sich farblose Nadeln oder Blättchen ab, welche meist zu kugeligen Aggregaten vereinigt sind. Sie bestehen der Hauptmenge nach aus dem Brucinsalz der Benzoyl-*l*-Asparaginsäure, welches aber erst durch häufig wiederholtes Umlösen aus heißem Wasser von dem Isomeren getrennt werden kann. Bei der vierten Kristallisation aus 200 ccm Wasser trat schon ein deutlicher Unterschied hervor; denn zuerst schieden sich große Prismen oder Tafeln ab, und die abgegossene Mutterlauge lieferte dann beim mehrstündigen Stehen feine, glänzende, meist kugelig vereinigte Nadeln. Diese Erscheinung wiederholte sich beim weiteren Umkristallisieren der großen Tafeln, und erst nach dreimaliger Kristallisation war das Salz ganz rein. Die Ausbeute betrug ungefähr 50 % der Theorie.

Zur Isolierung der Benzoylasparaginsäure wurden 25 g des Brucinsalzes in 200 ccm Wasser warm gelöst, mit 50 ccm Normal-Kalilauge versetzt, auf 0° abgekühlt, filtriert, die Mutterlauge mit 50 ccm Normal-Salzsäure versetzt und unter stark vermindertem Druck eingedampft. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ.

Das Produkt schmolz bei 180—181° (korr. 184—185°) und zeigte unter denselben Bedingungen, wie sie oben beschrieben sind, auch das Drehungsvermögen der Benzoyl-*l*-Asparaginsäure (gefunden $[\alpha]_D^{20} = +37,4°$).

Verwandlung der Benzoylverbindung in *l*-Asparaginsäure.

Die Spaltung findet vollständig statt, wenn die Benzoylverbindung mit der achtfachen Menge 10-prozentiger Salzsäure $2^1/_2$ Stunden auf 100° erhitzt wird. Die abgeschiedene Benzoësäure wird ausgeäthert, und beim Verdampfen der wässerigen Lösung bleibt das Chlorhydrat der Asparaginsäure zurück. Löst man dasselbe in wenig Wasser und versetzt mit der berechneten Menge Normal-Kalilauge, so scheidet sich in der Kälte die Asparaginsäure ab. Zum Vergleich mit der gewöhnlichen, natürlichen Verbindung wurde die optische Untersuchung in alkalischer Lösung ausgeführt.

Eine Lösung vom Gewicht 11,5923 g, welche 0,3853 g Substanz und 3 Mol.-Gew. Natriumhydroxyd enthielt und das spez. Gewicht 1,0394 besaß, drehte im 2-Dezimeterrohr bei 20° das Natriumlicht 0,155° nach links. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20} = -2,24°$.

Zum Vergleich wurde reine, käufliche Asparaginsäure (aus gewöhnlichem Asparagin), welche nochmals aus Wasser umkristallisiert und deren Reinheit durch eine Stickstoffbestimmung und durch Alkalimetrie kontrolliert war, zunächst ganz unter den gleichen Bedingungen untersucht:

Eine Lösung von 13,2857 g, welche 0,4454 g Substanz und 3 Mol.-Gew. Natriumhydroxyd enthielt und das spez. Gewicht 1,0398 besaß, drehte bei 20° im 2-Dezimeterrohr das Natriumlicht 0,165° nach links. Mithin $[\alpha]_D^{20} = -2,37°$.

Dann wurden noch zwei weitere Versuche bei größerer Konzentration und mit 2 Mol.-Gew. Base ausgeführt. Sie zeigen, daß mit steigender Konzentration die spezifische Drehung abnimmt:

1. Eine Lösung von 20,4814 g, welche 1,2290 g Substanz und 2 Mol.-Gew. Natriumhydroxyd enthielt und das spez. Gewicht 1,0521 besaß, drehte bei 20° im 2-Dezimeterrohr das Natriumlicht 0,24° nach links. Mithin $[\alpha]_D^{20} = -1,9°$.

2. Eine Lösung von 12,3382 g, welche 1,1382 g Substanz und 2 Mol.-Gew. Natriumhydroxyd enthielt und das spez. Gewicht 1,0811 besaß, drehte bei 20° im 2-Dezimeterrohr das Natriumlicht 0,23° nach links. Mithin $[\alpha]_D^{20} = -1,15°$.

Diese Werte stimmen leidlich überein mit den Angaben von Pasteur[1]) über die spezifische Drehung des asparaginsauren Natriums, welche er für eine 13-prozentige Lösung bei 12° und für weißes Licht —2,23° fand. Sie weichen dagegen stark von den Angaben A. Beckers[2]) ab. Letzterer fand unter Bedingungen, wie die oben innegehaltenen, und bei einem Natriumgehalt, welcher von 1—5 Mol.-Gew. schwankte, die spezifische Drehung der Asparaginsäure $[\alpha]_D = -9,04$ bis $-9,07°$.

Da zur Zeit von Beckers Untersuchung für die Darstellung der Asparaginsäure eine bequeme Methode fehlte, so ist zu vermuten, daß er ein unreines, vielleicht asparaginhaltiges Material für seine Bestimmungen benutzt hat.

Benzoyl-*d*-Asparaginsäure: Dieselbe befindet sich in den Mutterlaugen, aus welchen das benzoyl-*l*-asparaginsaure Brucin auskristallisiert ist. Zu ihrer Reinigung dient, wie schon erwähnt, das saure Brucinsalz. Um dasselbe darzustellen, ist es aber zunächst nötig, die Benzoylasparaginsäure aus den Laugen zu isolieren. Das geschah, wie bei dem obigen Versuch, durch Fällen des Brucin mit überschüssiger Kalilauge, Ansäuern des Filtrats mit der entsprechenden Menge Salzsäure und Konzentrieren durch Eindampfen im Vakuum. Aus den

---

[1]) Ann. d. Chem. **82**, 328.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **14**, 1037.

Mutterlaugen des obigen Versuches wurden im ganzen 11 g trockne Benzoylasparaginsäure zurückgewonnen.

Als 10,3 g davon mit 20,3 g Brucin (1 Mol.) in 100 ccm heißem Wasser gelöst waren, schied sich beim längeren Stehen der erkalteten Flüssigkeit das saure Brucinsalz in kleinen, hübsch ausgebildeten Prismen ab. Das Salz wurde zunächst dreimal aus je 150 ccm Wasser umkristallisiert. Seine Menge betrug dann 14 g. Da die aus einer Probe regenerierte Benzoyl-*d*-Asparaginsäure bei der optischen Untersuchung noch etwas zu schwaches Drehungsvermögen zeigte, so wurde das Salz noch zweimal in der gleichen Art aus Wasser umgelöst. Die jetzt isolierte Benzoyl-*d*-Asparaginsäure schmolz bei 180—181° (korr. 184—185°) und hatte auch das Drehungsvermögen des optischen Antipoden.

0,523 g Substanz wurde mit 2 Mol.-Gew. KOH und Wasser gelöst; das Gesamtgewicht der Lösung betrug 5,3669 g und das spezifische Gewicht 1,065. Sie drehte im 1-Dezimeterrohr das Natriumlicht 3,9° nach links. Daraus berechnet sich für Benzoyl-*d*-Asparaginsäure in alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20} = -37{,}6^0$. Die Differenz mit dem optischen Antipoden (0,2°) liegt innerhalb der Versuchsfehler.

Zur Umwandlung in die *d*-Asparaginsäure wurde die Benzoylverbindung ebenso behandelt, wie es oben für die optisch-isomere Substanz beschrieben ist. Die so erhaltene Asparaginsäure ist zweifellos identisch mit der von Piutti aus dem rechtsdrehenden Asparagin erhaltenen. Für die optische Bestimmung wurde hier die salzsaure Lösung benutzt.

0,3419 g Substanz wurden mit 3 Mol.-Gew. Salzsäure gelöst; das Gesamtgewicht der Lösung betrug 8,2273 g, das spez. Gewicht 1,032 und die Drehung bei 20° im 1-Dezimeterrohr bei Natriumlicht 1,09° nach links. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20} = -25{,}5^0$.

Zum Vergleich diente natürliche *l*-Asparaginsäure, welche unter denselben Bedingungen folgendes Resultat gab:

0,3455 g Substanz wurden mit 3 Mol.-Gew. Salzsäure gelöst; das Gesamtgewicht der Lösung betrug 8,2749 g, das spez. Gewicht 1,033 und die Drehung bei 20° im 1-Dezimeterrohr bei Natriumlicht 1,107° nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20} = +25{,}7^0$.

Ein zweiter Versuch bei größerer Konzentration (Prozentgehalt 8,8173 und spez. Gewicht 1,0705) aber sonst gleichen Bedingungen gab $[\alpha]_D^{20} = +26{,}47^0$.

Dieser Wert nähert sich sehr der alten von Pasteur[1]) angegebenen Zahl 27,86, welche ungefähr bei gleicher Konzentration der Lösung, aber für weißes Licht (Übergangsfarbe) gefunden wurde.

---

[1]) Ann. d. Chem. **82**, 325.

Stark abweichend sind dagegen wieder die Werte, welche Becker[1]) gefunden hat. Über die vermutliche Ursache dieser Differenz habe ich mich oben ausgesprochen.

Benzoylglutaminsäure.

Die Benzoylierung der Glutaminsäure läßt sich, ebenso wie bei der Asparaginsäure, mit recht befriedigender Ausbeute auf nassem Wege mit Benzoylchlorid und Natriumbicarbonat ausführen. Verwendet man die racemische Glutaminsäure, so ist selbstverständlich auch das Benzoylderivat racemisch. Bei Benutzung von optisch-aktiver, natürlicher Glutaminsäure findet dagegen eine Komplikation statt, indem ein Teil des Produktes während des chemischen Vorganges racemisiert wird und mithin ein Gemenge von aktivem und racemischem Benzoylkörper erhalten wird.

Racemische Benzoylglutaminsäure: 10 g racemische Glutaminsäure werden mit 46 g Natriumbicarbonat in 150 ccm Wasser eingetragen und geschüttelt, bis die Säure in Lösung gegangen ist; ein Teil des Bicarbonats bleibt dabei ungelöst. Dazu fügt man allmählich unter dauerndem, starkem Schütteln 30 g Benzoylchlorid. Im Laufe von $^3/_4$—1 Stunde kann die Operation bei Zimmertemperatur beendet werden. Benzoylchlorid und Bicarbonat gehen während derselben in Lösung, und die Flüssigkeit ist zum Schluß nur schwach getrübt. Jetzt wird dieselbe filtriert und mit 50 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 angesäuert. Dabei scheidet sich sofort eine reichliche Menge von Benzoësäure ab, beim Abkühlen in Eis und längerem Stehen kristallisiert in der Regel auch der größte Teil der Benzoylglutaminsäure. Da aber zuweilen die Kristallisation ausbleibt, so empfiehlt es sich, jedenfalls die wässerige Mutterlauge unter stark vermindertem Druck einzudampfen und dann wieder abzukühlen. Das Gemisch von Benzoësäure und Benzoylglutaminsäure wird nach dem Trocknen wiederholt mit Ligroïn ausgekocht, wobei die Benzoësäure in Lösung geht. Die Ausbeute an Benzoylglutaminsäure beträgt ca. 80% der Theorie. Das Produkt wird zur Reinigung aus 4 Teilen heißem Wasser umkristallisiert. Die farblosen, langen, schmalen Blättchen, welche öfters kugelig verwachsen sind, enthalten nach dem Trocknen an der Luft 1 Mol. Kristallwasser, welches im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur sehr langsam, dagegen bei 80° im Vakuum schon innerhalb 2 Stunden völlig entweicht.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **14**, 1038.

0,5769 g Sbst. verloren: 0,0369 g H_2O.

$C_{12}H_{13}NO_5 + H_2O$. Ber. H_2O 6,69. Gef. H_2O 6,40.

Die Analyse des getrockneten Produktes ergab:

0,1714 g Sbst.: 0,3608 g CO_2, 0,0780 g H_2O.

0,2015 g Sbst.: 9,8 ccm N (17°, 764 mm).

$C_{12}H_{13}NO_5$. Ber. C 57,37, H 5,18, N 5,58.
Gef. „ 57,41, „ 5,06, „ 5,67.

Die getrocknete Säure schmilzt bei 152—154° (korr. 155—157°) zu einer farblosen Flüssigkeit. Die wasserhaltige Verbindung löst sich in 124 Teilen Wasser von 20°. (Für die Bestimmung diente eine Lösung, welche durch 5-stündiges Schütteln der gepulverten Substanz mit Wasser von 20° hergestellt war.) In Alkohol ist sie leicht löslich.

Ihre Salze mit Kalium, Natrium, Calcium und Baryum sind selbst in kaltem Wasser leicht löslich. Schwer löslich ist das Silbersalz; es kristallisiert aus der ammoniakalischen Lösung beim Wegkochen des Ammoniaks in feinen, farblosen Nadeln.

Wird die optisch-aktive, natürliche Glutaminsäure in der oben beschriebenen Weise benzoyliert, so beobachtet man zunächst die gleichen Erscheinungen. Aber beim Ansäuern der wässerigen Lösung mit Salzsäure bleibt das leichter lösliche Benzoylprodukt in der Mutterlauge, während die Benzoësäure auskristallisiert. Wird das Filtrat unter stark vermindertem Druck eingedampft, so scheidet sich der Benzoylkörper zunächst als Öl ab, welches aber beim mehrtägigen Stehen kristallinisch erstarrt. Zur Entfernung der beigemengten Benzoësäure wird ebenfalls mit Ligroïn ausgekocht. Die Ausbeute an Benzoylkörper beträgt dann 60—65% der Theorie. Aus heißer, wässeriger Lösung scheidet er sich zunächst wieder als Öl aus, wird aber allmählich, besonders nach dem Einimpfen eines Kristalles, fest. Wie schon erwähnt, ist das Präparat ein Gemisch von aktiver und racemischer Benzoylglutaminsäure. Das beweist der unkonstante Schmelzpunkt, ferner der schwankende Gehalt an Kristallwasser und endlich die optische Untersuchung in alkalischer Lösung. Aus ihrem Resultat wurde in einem Falle das Verhältnis von optisch-aktivem zu Racemkörper wie 3 : 2 festgestellt.

Die teilweise Racemisierung der Glutaminsäure durch Benzoylierung bei niederer Temperatur ist beachtenswert und scheint durch besondere Verhältnisse bedingt zu sein. Denn bei der Benzoylierung der aktiven Asparaginsäure und des aktiven Alanins wurde nichts Ähnliches beobachtet.

Spaltung der racemischen Benzoylglutaminsäure in die optischen Komponenten.

Obschon die beiden Brucinsalze sehr schön kristallisieren, so sind sie doch für den vorliegenden Zweck wenig geeignet. Bessere Dienste leistet das neutrale Strychninsalz.

Zur Bereitung desselben werden 35 g wasserhaltige *dl*-Benzoylglutaminsäure mit 87 g (2 Mol.) gepulvertem Strychnin in 450 ccm heißem Wasser gelöst. Nach dem Erkalten beginnt langsam die Kristallisation. Nach 20-stündigem Stehen im Eisschrank wird die Masse abgesaugt und wieder in 500 ccm heißem Wasser gelöst. Die Kristallisation erfolgt jetzt in der Kälte rascher, so daß nach 6-stündigem Stehen im Eisschrank filtriert werden kann. Man wiederholt die Kristallisation aus der gleichen Menge Wasser noch zweimal, wobei es vorteilhaft ist, beim Auflösen einige Gramm gepulvertes Strychnin der Flüssigkeit zuzusetzen und dann zu filtrieren. Bei jeder Operation werden die Kristalle des Salzes schöner, zur völligen Reinigung ist es aber nötig, dieselben noch zweimal umzukristallisieren, wozu wegen der geringeren Menge 400 ccm Wasser ausreichen. Das Salz bildet schließlich feine, farblose, lange, schmale Blättchen, welche vielfach kugelförmig verwachsen sind. Die Ausbeute betrug zum Schluß 21 g, während theoretisch 60 g trocknes, aktives, neutrales, benzoylglutaminsaures Strychnin der Menge der racemischen Verbindung entsprachen.

Die dem Salze zugrunde liegende Benzoylverbindung entspricht der *l*-Glutaminsäure, und ich bezeichne sie deshalb als

Benzoyl-*l*-glutaminsäure.

Zur Darstellung der freien Säure werden 20 g des Salzes in 400 ccm heißem Wasser gelöst, mit 48 ccm Normalkalilauge versetzt und das abgeschiedene Strychnin nach guter Abkühlung filtriert. Die Mutterlauge wird mit 52 ccm Normal-Salzsäure angesäuert und im Vakuum stark eingedampft. Beim Abkühlen der konzentrierten Lösung scheidet sich die aktive Benzoylglutaminsäure zunächst als zähes Öl ab, welches aber bei 0° nach einiger Zeit kristallinisch erstarrt. Die Ausbeute beträgt 4,6 g. Zur Reinigung wird sie aus heißem Wasser, wovon weniger als zwei Teile zur Lösung genügen, umkristallisiert. Sie scheidet sich beim Erkalten langsam in meistens dreieckig geformten Blättchen oder kompakten Aggregaten aus, die keine scharfe Umgrenzung zeigen. An der Luft getrocknet, enthält die Säure kein Kristallwasser.

0,17 g Sbst.: 0,3584 g CO_2, 0,0851 g H_2O.

$C_{12}H_{13}NO_5$. Ber. C 57,37, H 5,18.

Gef. „ 57,49, „ 5,56.

Sie schmilzt bei 128—130° (korr. 130—132°), mithin 25° niedriger, als die racemische Verbindung. Von dieser unterscheidet sie sich auch durch die viel größere Löslichkeit in Wasser. Denn sie löst sich bei 20° schon in 21 Teilen und beim Kochen in weniger als 2 Teilen. Die wässerige Lösung dreht rechts.

Eine Lösung von 10,6982 g, die 0,5132 g Substanz enthielt und das spez. Gewicht 1,0114 besaß, drehte bei 20° im 2-Dezimeterrohr das Natriumlicht 1,34° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = +13,81°$. In alkalischer Lösung dreht sie dagegen nach links.

1,0863 g, mit 2 Mol.-Gew. KOH gelöst, so daß das Gewicht der Lösung 11,4223 g und das spez. Gewicht 1,0588 betrug, drehten im 2-Dezimeterrohr das Natriumlicht 3,77° nach links. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20}$ in alkalischer Lösung zu —18,7°. Eine stärkere Drehung wurde nicht erhalten, wenn auch das Strychninsalz noch öfters, als oben angegeben, umkristallisiert war, woraus man schließen darf, daß die untersuchte Säure rein war.

Verwandlung der Benzoylverbindung in die *l*-Glutaminsäure: 1,5g wurden mit 12ccm 10-prozentiger Salzsäure 3½ Stunden auf 100° erhitzt, die in Freiheit gesetzte Benzoësäure ausgeäthert und die salzsaure Lösung im Vakuum verdampft. Eine kleine Menge von Benzoylglutaminsäure war noch unzersetzt und mit der Benzoësäure in den Äther gegangen. Infolgedessen betrug die Ausbeute an salzsaurer Benzoylglutaminsäure nur 0,9 g, während 1,1 g berechnet sind. Das Chlorhydrat wurde mit der berechneten Menge Normal-Kalilauge zerlegt und die abgeschiedene Säure aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Sie schied sich beim Erkalten in feinen, schillernden Blättchen ab und wurde für die Analysen bei 100° getrocknet.

0,2063 g Sbst.: 0,3074 g CO_2, 0,1129 g H_2O.

$C_5H_9NO_4$. Ber. C 40,82, H 6,12.
Gef. „ 40,64, „ 6,08.

Die Säure schmolz beim raschen Erhitzen gleichzeitig mit einem Präparat von Glutaminsäure aus Caseïn bei 208° (korr. 213°) unter Zersetzung. Die Abweichung der Angaben von E. Schulze[1]) erklärt sich durch die Zersetzung. Für die optische Untersuchung diente die salzsaure Lösung, welche bekanntlich viel stärker dreht, als die freie Glutaminsäure.

0,2863 g *l*-Glutaminsäure wurden mit der äquimolekularen Menge Salzsäure in Wasser gelöst. Die Flüssigkeit, welche 5,4078 g wog, das

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **16**, 314.

spez. Gewicht 1,0233 hatte und 5,3011% Glutaminsäure enthielt, drehte im 1-Dezimeterrohr das Natriumlicht 1,63° nach links, woraus sich in äquimolekularer salzsaurer Lösung $[\alpha]_D^{20}$ —30,05° berechnet.

Zum Vergleich diente eine *d*-Glutaminsäure aus Caseïn. Eine Lösung von 12,1308 g, welche 0,65 g oder 5,3583% *d*-Glutaminsäure mit der äquivalenten Menge Salzsäure enthielt und das spez. Gewicht 1,0237 hatte, drehte im 2-Dezimeterrohr das Natriumlicht 3,34° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20}$ in äquimolekularer salzsaurer Lösung +30,45°.

Schulze und Boßhard[1]) geben einen etwas höheren Wert 31,1° an, aber sie haben eine erheblich größere Menge von Salzsäure angewandt, wodurch die kleine Differenz wahrscheinlich ihre Erklärung findet. Stark abweichend ist dagegen die Beobachtung von Scheibler[2]) $[a]_D = +25,5°$.

Benzoyl-*d*-glutaminsäure.

In den Mutterlaugen, welche von der Gewinnung des benzoyl-*l*-glutaminsauren Strychnins herrühren, befindet sich alle Benzoyl-*d*-glutaminsäure, selbstverständlich neben einer geringeren Menge des optischen Isomeren. Wird daraus die Säure in Freiheit gesetzt, so scheidet sich zuerst die schwerer lösliche racemische Verbindung ab, und aus der Mutterlauge läßt sich dann die Benzoyl-*d*-glutaminsäure durch bloße Kristallisation in fast reinem Zustand gewinnen. Dem entspricht folgende Vorschrift:

Die erwähnten Mutterlaugen, welche noch ungefähr 100 g Strychninsalz enthielten, wurden auf ca. 1 L im Vakuum eingedampft, mit 230 ccm Normal-Kalilauge versetzt, das ausgefällte Strychnin nach mehrstündigem Stehen der Flüssigkeit bei 0° abfiltriert, das Filtrat mit 240 ccm Normalsalzsäure übersättigt und im Vakuum auf ca. 150 ccm eingedampft. Beim Erkalten schied sich die racemische Säure ab, und nach gutem Kühlen in Eiswasser betrug ihre Menge 20 g. Als die Mutterlauge im Vakuum weiter stark eingedampft war, schied sich beim Stehen in der Kälte die aktive Säure als dickes Öl und der Rest des Racemkörpers in Kristallen ab. Das Öl konnte größtenteils von den letzteren mit wenig Wasser abgeschlämmt werden; der Rest, welcher an den Kristallen haftete, wurde samt den letzteren in wenig heißem Wasser gelöst, dann der Racemkörper durch Abkühlen wieder ausgeschieden und die Mutterlauge von neuem zur Gewinnung des aktiven Produktes eingedampft. Das Öl verwandelte sich im Laufe von 24 Stunden oder rascher beim Einimpfen von Kriställchen des aktiven Körpers

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **10**, 143.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 1728.

in eine kristallinische Masse. Ihre Menge betrug 7,2 g. Das Präparat war gelb gefärbt, und da Tierkohle die Farbe nicht wegnimmt, so wurde es zur Reinigung in heißem Wasser gelöst und mit einem Überschuß von zweifach-basischem Bleiacetat versetzt. Das hierbei ausfallende Bleisalz ist zunächst undeutlich kristallinisch, verwandelt sich aber beim längeren Stehen mit der Mutterlauge in schöne Nädelchen. Es wurde filtriert, dann in heißem Wasser suspendiert, durch Schwefelwasserstoff zersetzt und das farblose Filtrat im Vakuum bis auf einige Kubikzentimeter eingedampft. Beim längeren Stehen in der Kälte schieden sich jetzt feine, seidenglänzende Nädelchen aus, welche meist zu konzentrischen Aggregaten vereinigt waren und die Flüssigkeit breiartig erfüllten. Das Präparat war noch nicht ganz frei von Racemkörpern; nach der optischen Bestimmung enthielt es von letzterem etwa 10 %. Eine Lösung von 11,5133 g, die 1,0715 g Substanz mit 2 Mol.-Gew. KOH enthielt und das spez. Gewicht 1,0571 hatte, drehte bei 20° im 2-Dezimeterrohr das Natriumlicht 3,38° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = +17,18°$, während bei der reinen Benzoyl-*l*-glutaminsäure —18,7° gefunden wurden.

Die Verunreinigung verriet sich auch im Schmelzpunkt, denn die Substanz sinterte zwar stark bei 128°, war aber erst bei 137—139° vollständig geschmolzen.

Da eine völlige Entfernung des Racemkörpers durch bloße Kristallisation nicht zu erwarten war und auch kein anderes Salz mit einer aktiven Base gefunden wurde, welches die völlige Reinigung dieser Benzoyl-*d*-glutaminsäure ermöglicht hätte, so wurde das Präparat zur Darstellung der *d*-Glutaminsäure selbst benutzt, welche sich leicht als schwer lösliches Hydrochlorat von der kleinen Menge des Racemkörpers trennen läßt.

Synthetische *d*-Glutaminsäure.

2,5 g der oben erwähnten, noch etwas verunreinigten Benzoylverbindung wurden mit 20 ccm 10-prozentiger Salzsäure 4 Stunden im Wasserbade erhitzt, dann die Benzoësäure ausgeäthert und die salzsaure Lösung im Vakuum eingedampft. Der bald kristallinisch werdende Rückstand wurde aus 20-prozentiger, heißer Salzsäure umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 1,2 g und nach nochmaligem Umkristallisieren aus derselben Salzsäure 0,8 g. In wenig Wasser gelöst und mit der berechneten Menge Normalkali versetzt, gab das Salz die freie *d*-Glutaminsäure, welche nach dem Abkühlen in Eis filtriert und nochmals aus Wasser umkristallisiert wurde. Das Präparat zeigte dann beim raschen Erhitzen denselben Zersetzungspunkt 208° (korr. 213°)

wie die natürliche Glutaminsäure und ebenso in salzsaurer Lösung das Drehungsvermögen der letzteren.

Eine Lösung von 6,4137 g, die 0,3036 g Glutaminsäure und 1 Mol.-Gew. Salzsäure enthielt und das spez. Gewicht 1,0203 besaß, drehte bei 20⁰ im 1-Dezimeterrohr das Natriumlicht 1,49⁰ nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20} = +30,85^0$, während für die natürliche Glutaminsäure aus Caseïn $+30,45^0$ gefunden wurden.

Versuch zur Spaltung der Hippursäure.

Obschon die Säure kein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält, schien es mir doch nicht überflüssig, ihr Verhalten gegen die optisch-aktiven Basen zu prüfen. Zur Anwendung kamen Morphin, Strychnin, Chinin und Brucin, von welchen nur die beiden letzteren kristallisierte Salze lieferten. Besonders schön ist die Brucinverbindung.

Löst man 10 g Hippursäure und 26 g der Base in 30 ccm heißem Wasser, so scheidet sich aus der dicken Flüssigkeit nach dem Erkalten im Laufe von einigen Stunden ein dicker Brei von Kristallen ab, welcher aus mikroskopisch kleinen, unregelmäßig begrenzten Blättchen besteht. Nach nochmaliger Kristallisation aus derselben Menge Wasser werden große, aber sehr dünne, meist sechsseitige Blätter erhalten. Das Salz wurde viermal aus Wasser umkristallisiert, wobei die schließlich erhaltene Ausbeute auf etwa $^1/_{10}$ der ursprünglichen Menge zurückging. Die daraus regenerierte Hippursäure zeigte den Schmelzpunkt des Ausgangsmaterials und in alkalischer Lösung keine wahrnehmbare Drehung.

Zur Darstellung des Chininsalzes wurden 3 g Hippursäure mit 6,3 g Chinin in 150 ccm Wasser heiß gelöst. Beim Erkalten fiel zunächst ein Öl aus, welches aber nach einigem Stehen zu kugeligen Kristallaggregaten erstarrte. Das Salz wurde noch zweimal aus Wasser umkristallisiert und dann die Hippursäure regeneriert. Sie war ebenfalls optisch-inaktiv. Es scheint also auf diesem Wege eine Verwandlung der Hippursäure in optisch-aktive Formen nicht möglich zu sein, was mit den geltenden theoretischen Anschauungen im Einklang steht.

Spaltung des Benzoyltyrosins.

Im Gegensatz zum Tyrosin selbst bildet die von Erlenmeyer jun. synthetisch dargestellte, racemische Benzoylverbindung[1]) mit den Alkaloïden beständige Salze. Von diesen scheint mir gleichfalls das Brucinsalz für die Darstellung der optisch-aktiven Formen am meisten ge-

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **30**, 2981 und Ann. d. Chem. **307**, 138.

eignet zu sein. Dasselbe fällt aus heißem Wasser, worin es ziemlich schwer löslich ist, beim Erkalten zunächst als zäher Sirup aus, aber beim längeren Stehen bilden sich auch Kristalle, und durch systematisches Lösen und Abkühlen ließ sich daraus in erheblicher Menge ein kristallisiertes Salz darstellen, welches, mit Alkali zerlegt, aktives Benzoyltyrosin lieferte. Dasselbe schmolz bei 163—164° (korr. 166—167°), d. i. mehr als 20° niedriger, als die racemische Verbindung und zeigte in alkalischer Lösung die spezifische Drehung +18,8°.

Über seine Verwandlung in aktives Tyrosin, sowie über die Versuche zur Isolierung des optischen Antipoden hoffe ich bald Näheres mitteilen zu können. Ferner beabsichtige ich, das neue Verfahren auch für die Spaltung des racemischen Leucins und einiger anderer, synthetischer Aminosäuren zu benutzen.

Bei obigen Versuchen habe ich mich der eifrigen und geschickten Hilfe des Herrn Dr. F. Hübner erfreut, wofür ich demselben besten Dank sage.

---

2. Emil Fischer: Spaltung einiger racemischer Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten. II.

Bericht der deutschen chemischen Gesellschaft **32**, 3638 (1900).
(Eingegangen am 22. Dezember.)

Wie in der ersten Mitteilung[1]) schon kurz erwähnt wurde, läßt sich aus dem von Erlenmeyer und Halsey[2]) synthetisch bereiteten Benzoyltyrosin mit Hilfe des Brucinsalzes eine optisch-aktive Verbindung gewinnen, welche 30⁰ niedriger schmilzt und in alkalischer Lösung ziemlich stark nach rechts dreht. Die nähere Untersuchung derselben hat ergeben, daß sie das Derivat des natürlichen, aus Caseïn, Conglutin und anderen Eiweißkörpern entstehenden Tyrosins ist, welches man wegen der Linksdrehung der sauren oder alkalischen Lösung wohl als die *l*-Verbindung bezeichnen darf. Sie wird nämlich durch 10-prozentige Salzsäure bei 100⁰ glatt in Benzoësäure und diese Base gespalten. Dementsprechend nenne ich sie Benzoyl-*l*-tyrosin und das inaktive synthetische Produkt, welches wegen des höheren Schmelzpunktes als echter Racemkörper zu betrachten ist, *dl*-Benzoyltyrosin.

Die Gewinnung des optischen Antipoden hat größere Schwierigkeiten gemacht. Sie ist aber schließlich durch Kristallisation des Cinchoninsalzes gelungen, und durch Spaltung mit Salzsäure wurde daraus auch das bisher in reinem Zustande unbekannte *d*-Tyrosin erhalten.

Die Synthese des racemischen Tyrosins ist schon vor 16 Jahren von Erlenmeyer sen. und Lipp[3]) mit Hilfe des *p*-Nitrophenylalanins ausgeführt worden. Ein zweites, davon ganz verschiedenes Verfahren verdanken wir den interessanten Versuchen von Erlenmeyer jun.[4]), welche im nachfolgenden noch genauer besprochen werden.

Durch die eben erwähnten Resultate ist nun auch die totale Synthese der beiden optisch-aktiven Tyrosine verwirklicht.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2451. (*S. 87.*)
[2]) Ann. d. Chem. **307**, 138.
[3]) Ann. d. Chem. **219**, 170.
[4]) Ann. d. Chem. **307**, 138.

Darstellung des racemischen Benzoyltyrosins.

Bei der Reduktion der *p*-Oxy-α-benzoylaminozimmtsäure erhielten Erlenmeyer jun. und Halsey[1]) nur 10—15% Benzoyltyrosin. Für die Ausführung der später beschriebenen Versuche war es daher nötig, das Verfahren zu verbessern. Das ist gelungen durch Einhaltung bestimmter Bedingungen bei der Reduktion mit Natriumamalgam, ferner durch die Zerstörung der unveränderten *p*-Oxybenzoylaminozimmtsäure mit Alkali, welche Erlenmeyer bei der Bereitung des Phenylalanins schon benutzt hat, und endlich durch Umkristallisieren des Rohproduktes aus Eisessig, wobei die harzigen Produkte in Lösung bleiben. Die Ausbeute an kristallinischen Benzoyltyrosin konnte so auf 65—70% der Theorie gesteigert werden.

Man suspendiert 50 g *p*-Oxy-α-benzoylaminozimmtsäure, welche nach der Vorschrift von Erlenmeyer und Halsey aus Hippursäure und *p*-Oxybenzaldehyd leicht bereitet werden kann, in 500 ccm Wasser und fügt bei Zimmertemperatur, ohne zu kühlen, unter kräftigem Schütteln 500 g 2-prozentiges Natriumamalgam in kleinen Portionen zu, so daß die Operation etwa $^3/_4$ Stunden dauert. Das Amalgam wird rasch verbraucht und der Wasserstoff vollständig fixiert. Die Säure geht bald in Lösung, die Temperatur steigt auf etwa 35° und die Flüssigkeit wird anfangs braun, zum Schluß aber wieder hellgelb. Man gießt dann vom Quecksilber ab, fügt 100 ccm 33-prozentiger Natronlauge zu und kocht etwa 45 Minuten, bis kein Ammoniak mehr entweicht. Dadurch wird die nicht reduzierte Säure zerstört. Zu der abgekühlten Flüssigkeit fügt man noch etwa 400 ccm Wasser und dann unter weiterer Abkühlung überschüssige Salzsäure, wobei eine dicke, harzige, gelbrote Masse ausfällt. Bei abermaliger Abkühlung wird dieselbe hart, und bei längerem Stehen der Mutterlauge bei 0° kristallisiert noch eine ziemlich erhebliche Menge von weißen Blättchen. Wird die auf der Pumpe filtrierte und scharf abgesogene Masse in 80 ccm kochendem Eisessig gelöst, so fällt beim Erkalten das Benzoyltyrosin als dicker Brei von feinen Nädelchen aus, welche durch scharfes Absaugen und Abpressen, ferner durch Auswaschen mit wenig kaltem Eisessig und später mit Äther fast farblos werden. Die Ausbeute an diesem schon ziemlich reinen Produkt betrug 65—70%. Zur weiteren Reinigung wird dasselbe in der 100-fachen Menge siedendem Wasser gelöst, wobei ein geringer Rückstand bleibt, und mit Tierkohle gekocht. Aus dem Filtrat scheidet sich das Benzoyltyrosin beim 24-stündigen Stehen im Eisschrank zum größten Teil in weißen, zu Kugeln vereinigten Nädelchen

---

[1]) Ann. d. Chem. **307**, 141.

ab, deren Menge etwa 50% der angewandten *p*-Oxybenzoylaminozimmtsäure beträgt. Das Präparat schmilzt bei 191—193^0 (korr. 195—197^0), während Erlenmeyer und Halsey 182^0 gefunden haben.

Es macht äußerlich den Eindruck einer homogenen Substanz; aber bei der Spaltung mit Brucin wurde doch eine Beobachtung gemacht, welche es möglich erscheinen läßt, daß ihm eine kleine Menge einer isomeren Verbindung beigemengt ist.

Für die Umwandlung in Tyrosin haben Erlenmeyer und Halsey das Benzoylderivat mit konzentrierter Salzsäure auf 150^0 erhitzt. Glatter geht die Reaktion, wenn man die Substanz mit der 60-fachen Menge 20-prozentiger Salzsäure 4 Stunden am Rückflußkühler kocht. Sie geht dabei nach etwa $^1/_2$ Stunde in Lösung und diese färbt sich im Laufe der Operation schwach gelbrot. Schließlich wird auf 0^0 abgekühlt, die ausgeschiedene Benzoësäure abfiltriert und die Mutterlauge verdampft. Gegen Schluß des Eindampfens beginnt die Kristallisation des salzsauren Tyrosins. Verdünnt man jetzt mit Wasser und fügt soviel Natriumacetat hinzu, daß die Salzsäure gebunden wird, so fällt, zumal beim Abkühlen, das *dl*-Tyrosin fast vollständig in glänzenden, gelblich gefärbten Blättchen aus. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ, denn sie betrug 3,1 g aus 5 g Benzoylkörper. Zur Reinigung wurden diese 3,1 g in 1100 ccm kochendem Wasser gelöst und durch Tierkohle entfärbt. Aus dem Filtrat fällt dann das *dl*-Tyrosin beim Abkühlen in farblosen, kurzen, ziemlich dicken, häufig sternförmig gruppierten Nädelchen aus, welche von den langen, biegsamen, seidenglänzenden Fäden des aktiven Tyrosins schon äußerlich zu unterscheiden sind.

Erlenmeyer und Lipp[1]) geben an, daß das künstliche Tyrosin ebenso, wie das natürliche, sich zwischen 290 und 295^0 unter lebhafter Gasentwickelung zersetzt. Das trifft in der Tat bei langsamem Erhitzen zu. Erwärmt man dagegen schnell, wie es bei solchen zersetzlichen Stoffen ratsam ist, so tritt die Erscheinung beim natürlichen Tyrosin erst zwischen 310 und 314^0 (korr. 314 und 318^0) und bei der racemischen Verbindung 2—3^0 höher ein.

Abgesehen von der optischen Inaktivität unterscheidet sich das *dl*-Tyrosin von den beiden aktiven Formen durch die geringere Löslichkeit des Hydrochlorats in starker Salzsäure. Löst man z. B. die Base in der 20-fachen Menge Salzsäure vom spez. Gewicht 1,1, so scheidet sich schon bei gewöhnlicher Temperatur das Hydrochlorat ziemlich bald und zum größeren Teil in Nadeln aus, während unter den gleichen Bedingungen die aktiven Formen gelöst bleiben. Man kann dies Verhalten sogar benutzen, um aus einem Gemisch bei weitem den größten Teil

---

[1]) Ann. d. Chem. **219**, 170.

der racemischen Base zu entfernen, indem man in der angegebenen Menge Salzsäure löst und dann längere Zeit bei 0⁰ stehen läßt.

Spaltung des racemischen Benzoyltyrosins in die aktiven Komponenten.

20 g fein gepulvertes, umkristallisiertes *dl*-Benzoyltyrosin werden mit 33 g Brucin in 2 L siedendem Wasser gelöst. Beim Erkalten trübt sich die Flüssigkeit rasch, und nach 15-stündigem Stehen ist ein gelblicher, zäher Sirup in reichlicher Menge abgesetzt. In der abgegossenen Mutterlauge beginnt dann nach einiger Zeit, zumal beim häufigen Reiben oder Impfen, die Kristallisation des Brucinsalzes und wird durch häufiges Umschütteln so beschleunigt, daß nach weiteren 12 Stunden der größte Teil der einen Modifikation abgeschieden ist. Man filtriert jetzt die Kristalle, löst den ersten Sirup durch Erhitzen mit der Mutterlauge auf dem Wasserbade und erhält beim längeren Stehen der erkalteten Flüssigkeit eine zweite Kristallisation. Die Wiederholung der Operation gibt dann noch eine dritte, aber recht geringe Kristallisation. Die Gesamtausbeute an kristallisiertem Brucinsalz betrug ebensoviel, wie die Menge des angewandten Benzoyltyrosins. Zur Reinigung wird das Salz in der 40-fachen Menge kochendem Wasser gelöst, wobei es zuerst schmilzt. Das beim Erkalten ausfallende Öl verwandelt sich nach kurzer Zeit in Kristalle, welche durch abermalige Kristallisation aus derselben Menge Wasser in glänzenden, vierkantigen Täfelchen, deren Ecken häufig schief abgeschnitten sind, erhalten werden. Seine Menge geht dabei auf $^2/_3$ des kristallisierten Rohprodukts zurück. Beim weiteren Umkristallisieren des Salzes ändert sich weder die Kristallform noch das Drehungsvermögen des daraus abgeschiedenen Benzoyltyrosins, so daß man das Salz schon nach 2-maliger Kristallisation aus Wasser als rein ansehen darf. Es wurde nicht analysiert.

Zur Umwandlung in Benzoyltyrosin löst man 10 g des reinen Salzes in 450 ccm kochendem Wasser, fügt 30 ccm Normalkalilauge zu, kühlt auf 0⁰ ab, filtriert nach 1-stündigem Stehen das auskristallisierte Brucin ab und versetzt die Mutterlauge mit 45 ccm Normalsalzsäure.

Beim Verdampfen der Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck auf etwa 15 ccm fällt das Benzoyltyrosin zuerst als harzige, farblose Masse aus, welche sich aber nach einiger Zeit schon während des Eindampfens in Kristalle verwandelt. Dieselben werden nach völligem Erkalten abfiltriert, mit schwach salzsäurehaltigem Wasser gewaschen, in etwa 80 ccm siedendem Wasser gelöst, mit etwas Tierkohle behandelt und das Filtrat mit ein Paar Tropfen Salzsäure versetzt. Beim Abkühlen scheidet sich das aktive Benzoyltyrosin zuerst in Öltropfen ab,

welche aber beim längeren Stehen zu schönen glänzenden Blättern oder Tafeln erstarren. Da diese Verbindung dem natürlichen *l*-Tyrosin entspricht, so ist sie als

Benzoyl-*l*-tyrosin

zu bezeichnen. Die Ausbeute an reinem kristallisierten Produkt betrug nach obigem Verfahren 22% des Racemkörpers, mithin 44% der Theorie.

Für die Analyse wurde bei 100⁰ getrocknet.

0,2008 g Sbst.: 0,4952 g CO_2, 0,0959 g H_2O.

0,2061 g Sbst.: 8,9 ccm N (20⁰, 761 mm).

$C_{16}H_{15}NO_4$. Ber. C 67,37, H 5,26, N 4,90.

Gef. „ 67,25, „ 5,30, „ 4,94.

Die Verbindung schmilzt bei 162—163⁰ (korr. 165—166⁰), mithin 30⁰ niedriger, als der Racemkörper. Sie ist auch in heißem Wasser erheblich leichter löslich als jener.

Für die Bestimmung des Drehungsvermögens diente eine wässerige Lösung, welche die für 1 Molekül berechnete Menge Kaliumhydroxyd enthielt. Das Drehungsvermögen ändert sich etwas mit der Konzentration.

	I	II
Gesamtgewicht der Lösung	11,5477 g,	11,8693 g,
Gewicht des Benzoyltyrosins	0,928 g,	0,607 g,
Gehalt an Alkali	3,4 ccm,	2,3 ccm Normalkalilauge,
spezifisches Gewicht	1,0343,	1,0211,
Drehung bei 20⁰ im 2 dm-Rohr	3,20⁰,	1,91⁰.

Mithin $[\alpha]_D^{20^0} = +19,25^0$ in 8-prozentiger alkalischer Lösung und $[\alpha]_D^{20^0} = +18,29^0$ in 5-prozentiger alkalischer Lösung.

Künstliches *l*-Tyrosin.

Beim vierstündigen Erhitzen des Benzoyl-*l*-tyrosins mit der 20-fachen Menge Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 auf 100⁰ findet eine vollständige Abspaltung des Benzoyls statt, aber gleichzeitig wird ein erheblicher Teil, d. h. fast die Hälfte des Tyrosins, racemisiert. Auch bei Anwendung von 20-prozentiger Salzsäure wurde eine solche Racemisierung, allerdings in viel schwächerem Maße, beobachtet. Dagegen gab eine 10-prozentige Salzsäure gute Resultate.

Dementsprechend wird 1 g des gepulverten Benzoyl-*l*-tyrosins mit 40 ccm 10-prozentiger Salzsäure im verschlossenen Gefäß 8 Stunden auf 100⁰ erhitzt. Im Anfang ist es nötig, öfter umzuschütteln, um die Substanz zu lösen. Schließlich wird die abgekühlte Flüssigkeit zur Entfernung der Benzoësäure ausgeäthert, dann unter vermindertem Druck

verdampft, der Rückstand von salzsaurem Salz mit Natriumacetat völlig zersetzt, und das abfiltrierte Tyrosin aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Das so erhaltene Präparat zeigte genau die äußere Form des aktiven Tyrosins, d. h. es schied sich aus Wasser in ganz langen, seidenglänzenden, biegsamen Nadeln ab.

Für die Bestimmung des Drehungsvermögens diente die salzsaure Lösung, und zwar zunächst die Lösung in 21-prozentiger Salzsäure, auf welche sich auch die meisten früheren Angaben über das optische Verhalten des natürlichen Tyrosins beziehen. Eine Lösung in Salzsäure von 21%, welche 3,94% Base enthielt und das spez. Gewicht 1,116 hatte, drehte bei 20° das Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr 0,76° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -8,64\,.$$

Für natürliches Tyrosin wurde bei gleicher Konzentration

von Mauthner[1] $[\alpha]_D^{16} = -7,98^0$,

von Landolt[2] $[\alpha]_D^{20} = -8,07^0$,

von Schulze und Boßhard[3] $[\alpha]_D = -8,48^0$

gefunden.

Wie man sieht, sind die Differenzen recht gering, und diejenigen zwischen den Bestimmungen von Schulze und Boßhard und den meinigen liegen sogar innerhalb der Beobachtungsfehler. Daß Mauthner und Landolt geringere Werte gefunden haben, erklärt sich vielleicht durch die geringere Reinheit der von ihnen benutzten Basen. Ich halte es aber auch für möglich, daß dem Tyrosin, welches aus Eiweißkörpern durch Spaltung mit starker Salzsäure, die man in der Regel für diesen Zweck verwendet, gewonnen ist, eine wechselnde Menge racemischer Base beigemischt ist; denn ein Präparat, welches aus reinem Benzoyl-*l*-tyrosin mit 20-prozentiger Salzsäure bei 100° dargestellt war, zeigte unter obigen Bedingungen

$$[\alpha]_D^{20} = -7,4^0,$$

und obschon das Produkt sonst ganz dem aktiven Tyrosin glich, enthielt es also offenbar schon eine erhebliche Menge von Racemkörpern.

Bei geringerer Konzentration der Salzsäure wächst das Drehungsvermögen des Tyrosins ziemlich stark, wie schon Schulze und Boßhard bei ihrem Präparat beobachteten; denn sie fanden für eine Lösung von 1 g Base in 20 ccm 4-prozentiger Salzsäure

$$[\alpha]_D = -15,6^0.$$

---

[1]) Monatsh. f. Chemie **3** (1882), 345.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 2838.

[3]) Zeitschr. f. physiolog. Chemie **9**, 98.

Das synthetische *l*-Tyrosin gab allerdings einen anderen Wert. Eine Lösung in 4-prozentiger Salzsäure, welche 4,68% Tyrosin enthielt und das spez. Gewicht 1,034 hatte, drehte bei 20° im 2-Dezimeterrohr 1,28° nach links. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -13{,}2^0 .$$

Ich habe deshalb zum Vergleich die Bestimmung mit natürlichem Tyrosin, welches aus Caseïn durch fünfstündiges Kochen mit 20-prozentiger Salzsäure dargestellt war, wiederholt und unter den gleichen Bedingungen gefunden

$$[\alpha]_D^{20} = -12{,}56^0 .$$

Also auch hier ist das Drehungsvermögen des natürlichen Produktes etwas geringer.

Die stärkere Abweichung der Zahl von Schulze und Boßhard kann ich mir deshalb nicht erklären.

Benzoyl-*d*-tyrosin.

Wie schon erwähnt, läßt sich die Verbindung aus dem Racemkörper durch das Cinchoninsalz gewinnen.

Löst man 1 g Benzoyltyrosin und 1 g Cinchonin in 150 ccm heißem Wasser, so scheidet sich nach dem Erkalten zunächst ein Sirup ab, der wenig Neigung zur Kristallisation hat. Aber beim mehrwöchentlichen Stehen erfolgt die Kristallisation, und wenn man einmal im Besitz der Kristalle ist, so wird die Gewinnung größerer Quantitäten sehr einfach. Man löst dann 20 g des *dl*-Benzoyltyrosins mit 20,6 g Cinchonin in 3 L kochendem Wasser und trägt in die nur wenig abgekühlte Lösung eine Probe des kristallisierten Salzes ein. Bei fortschreitender Abkühlung erfolgt dann sogleich die Abscheidung des Salzes in farblosen, ziemlich breiten Nadeln und ist nach 24 Stunden beendet. Zur völligen Reinigung wird dasselbe einmal aus 2 L, dann noch zweimal aus je $1^1/_2$ L heißem Wasser umkristallisiert und schließlich in derselben Weise zerlegt, wie es oben für das Brucinsalz des Benzoyl-*l*-tyrosins beschrieben wurde. Die Ausbeute an Benzoyl-*d*-tyrosin ist ebenso groß wie dort, sie betrug 42% der Theorie.

Die Substanz schmolz glatt bei 162° (korr. bei 165,5°). Die spezifische Drehung wurde ebenfalls in alkalischer Lösung, unter ganz ähnlichen Bedingungen, wie bei der *l*-Verbindung, bestimmt.

Eine Lösung von 7,716% und dem spez. Gewicht 1,048 drehte bei 20° im 2-Dezimeterrohr 3,17° nach links. Mithin in alkalischer Lösung

$$[\alpha]_D^{20} = -19{,}59^0,$$

während für die *l*-Verbindung +19,25° gefunden wurde.

d-Tyrosin.

Die Darstellung der Base aus dem Benzoylderivat geschah in der gleichen Weise wie bei dem optischen Antipoden. Sie schmolz unter Zersetzung, gerade so wie das Isomere, und gab nach dem Trocknen bei 100° folgende Zahlen:

0,2007 g Sbst.: 0,4378 g CO_2, 0,1117 g H_2O.

$C_9H_{11}NO_3$. Ber. C 59,66, H 6,07.
Gef. „ 59,49, „ 6,18.

Für die optische Bestimmung diente wiederum eine Lösung in Salzsäure von 21%.

Sie enthielt 4,6071% Tyrosin, hatte das spez. Gewicht 1,1175 und drehte bei 20° im 2-Dezimeterrohr das Natriumlicht 0,89° nach links. Daraus berechnet sich

$$[\alpha]_D^{20} = +8,64^0.$$

Über rechtsdrehendes Tyrosin liegt bisher nur eine recht unvollkommene Angabe vor. E. v. Lippmann fand in den bleichen Schößlingen der Zuckerrüben eine Base, welche er für Tyrosin erklärte, deren Lösung in 25-prozentiger Salzsäure aber nur

$$[\alpha]_D = +6,85^0$$

zeigte.

Ob das Produkt durch die Analyse, durch Schmelzpunkt und Löslichkeit mit dem gewöhnlichen Tyrosin verglichen wurde, ist nicht erwähnt. Es bleibt also zweifelhaft, ob von Lippmann wirklich den optischen Antipoden des *l*-Tyrosins unter Händen hatte.

Bevor die Spaltung mit Cinchonin aufgefunden war, wurde der Versuch gemacht, das *d*-Tyrosin aus den Mutterlaugen zu gewinnen, welche bei der Spaltung des *r*-Benzoyltyrosins resultierten. Dieselben wurden zunächst in der oben beschriebenen Weise von Brucin befreit und die Benzoylverbindungen durch Eindampfen der Lösung isoliert.

Da aus dem Gemisch das Benzoyl-*d*-tyrosin durch Kristallisation nicht in reinem Zustande zu isolieren war, so wurde das Rohprodukt durch Kochen mit der 60-fachen Menge 10-prozentiger Salzsäure zerlegt und das Tyrosin ebenfalls in der vorher beschriebenen Art isoliert. Zur Abscheidung des Racemkörpers diente dann das schwer lösliche Hydrochlorat. Zu dem Zweck wurde die rohe Base in der 20-fachen Menge Salzsäure vom spez. Gewicht 1,1 warm gelöst und die Flüssigkeit 12 Stunden bei 0° gehalten, wobei sich eine reichliche Menge des racemischen Tyrosinhydrochlorats in Nadeln ausschied. Die aus der Mutterlauge durch Verdampfen und Behandeln mit Natriumacetat iso-

lierte Base wurde dann mehrmals aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Wenn man hierbei die Kristallisation durch rasches Abkühlen bewerkstelligt und schnell filtriert, so läßt sich der Rest des Racemkörpers, wie es scheint, vollständig entfernen. Das so isolierte *d*-Tyrosin zeigt in der Kristallform, dem Schmelzpunkt und in der Zusammenzetzung ($C_9H_{11}NO_3$. Ber. C 59,66, H 6,07. Gef. C 59,46, H 6,21) völlige Übereinstimmung mit der reinen aktiven Base; aber das Drehungsvermögen war wesentlich größer. Denn eine Lösung des Produkts in 21-prozentiger Salzsäure zeigte ungefähr

$$[\alpha]_D^{20} = +11{,}6^0,$$

während eine Lösung in 4-prozentiger Salzsäure ungefähr

$$[\alpha]_D^{20} = +16{,}4^0$$

ergab.

Ich bin nicht in der Lage, den Grund dieser auffälligen Erscheinung angeben zu können, halte es aber für möglich, daß die stärkere Drehung von einer sehr ähnlichen, isomeren Substanz herrührt, deren Benzoylverbindung schon dem angewandten *dl*-Benzoyltyrosin beigemengt sein könnte.

Nach den bisherigen Resultaten ist die Spaltung der Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten mit Hilfe der Benzoylverbindungen eine ziemlich allgemein anwendbare Methode, welche ich noch in verschiedenen anderen Fällen benutzen will. So kann ich jetzt schon anführen, daß es auch gelungen ist, aus dem von Erlenmeyer dargestellten Benzoylphenylalanin[1]) mit Hilfe des Cinchoninsalzes ein optisch-aktives Isomeres zu gewinnen, welches bei 142—143⁰ (unkorr.) schmilzt und in Alkali gelöst ziemlich stark nach links dreht.

Bei den vorstehenden Versuchen habe ich mich der eifrigen und geschickten Hilfe des Herrn Dr. Fritz Lehmann erfreut, wofür ich demselben besten Dank sage.

[1]) Ann. d. Chem. 275, 18.

3. Emil Fischer: Spaltung racemischer Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten. III.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 33, 2370 (1900).
(Eingegangen am 4. August.)

Die Spaltung der Benzoylverbindungen durch Alkaloïde, welche bisher bei dem racemischen Alanin, Tyrosin, der Glutamin- und Asparaginsäure ausgeführt wurde, gelingt auch beim racemischen Leucin. Mit Hilfe des Cinchoninsalzes erhält man die in alkalischer Lösung linksdrehende Form in reinem Zustande, und das rechtsdrehende Isomere läßt sich ebenfalls völlig rein durch das Chinidinsalz gewinnen. Größere Schwierigkeiten bietet die Verwandlung der Benzoylkörper in die entsprechenden aktiven Leucine. Dieselben werden verhältnismäßig schwer hydrolysiert, am besten gelingt dies noch durch Kochen mit der hundertfachen Menge 10-prozentiger Salzsäure. Aber dabei findet eine teilweise Racemisierung statt; den so hergestellten aktiven Leucinen waren nach der optischen Untersuchung 4—10 % Racemkörper beigemengt. Wenn es somit auch nicht gelang, die aktiven Basen ganz rein auf synthetischem Wege darzustellen, so ist das Resultat immerhin beachtenswert, da man bisher das in der Natur so weit verbreitete, in wässeriger Lösung linksdrehende Leucin synthetisch überhaupt nicht darstellen konnte und den optischen Antipoden aus dem Racemkörper nur durch Pilzgärung erhalten hat[1]).

Die Neigung zur Racemisierung scheint beim Leucin überhaupt größer zu sein, als bei den meisten übrigen Aminosäuren. Das zeigte sich auch bei der Benzoylierung, wo bei Anwendung freier Natronlauge leicht eine partielle Racemisierung eintritt. Das Leucin nähert sich also in dieser Beziehung der Glutaminsäure[2]).

Die Benzoylderivate des Leucins sind so schön kristallisierte und durch ihre physikalische Eigenschaften so scharf definierte Produkte, daß sie eine willkommene Gelegenheit boten, das natürliche Leucin mit den synthetischen Aminocapronsäuren zu vergleichen.

---

[1]) E. Schulze und Boßhard, Zeitschr. für physiol. Chem. **10**, 138.

[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2466. (*S. 101.*)

Bekanntlich haben E. Schulze und Likiernik vor 9 Jahren[1]) nachgewiesen, daß das durch Erhitzen mit Barythydrat racemisierte natürliche Leucin mit der aus Isovaleraldehyd synthetisch erhaltenen α-Aminoisobutylessigsäure,

$$(CH_3)_2CH.CH_2.CH(NH_2).COOH\ ,$$

identisch ist, und durch Vergärung der letzteren mit Schimmelpilzen gelang es ihnen ferner, den optischen Antipoden des natürlichen Leucins zu gewinnen. Ihre Resultate werden durch die Untersuchung der Benzoylverbindungen bestätigt. Denn sowohl die racemischen wie die optisch-aktiven Benzoylkörper, welche einerseits aus dem natürlichen Leucin des tierischen Horns oder Caseïns und andererseits aus synthetischer α-Aminoisobutylessigsäure dargestellt waren, zeigten völlig gleiche Eigenschaften. Zu demselben Resultat führte schließlich noch die Vergleichung der beiden racemischen Benzolsulfoverbindungen. Andererseits gab die normale α-Aminocapronsäure ein Monobenzoylderivat, welches nicht allein durch den niedrigeren Schmelzpunkt (Unterschied 7°), sondern auch durch die Salze mit aktiven Basen, welche z. Z. von Herrn Hagenbach genauer untersucht werden, von dem *dl*-Benzoylleucin scharf unterschieden ist. Eine noch größere Differenz (21°) zeigte sich bei den Schmelzpunkten der Benzolsulfoverbindungen.

In den chemischen Lehrbüchern findet man trotz der Arbeit von Schulze die normale α-Aminocapronsäure noch immer als Leucin bezeichnet. Da diese Gewohnheit nur zu Verwechslungen führt, und da bisher die normale α-Aminocapronsäure überhaupt noch nicht mit Sicherheit in der Natur aufgefunden worden ist, so wird es sich empfehlen, den Namen Leucin nur für die Isoverbindung:

$$(CH_3)_2CH.CH_2.CH(NH_2).COOH\ ,$$

zu benutzen.

Darstellung des racemischen Leucins.

Trotz der vielen, über diesen Gegenstand gemachten Angaben halte ich die Mitteilung meiner Erfahrungen nicht für überflüssig, weil sich daraus Vorteile für die Praxis ergeben haben.

Um das racemische Leucin aus der natürlichen aktiven Base zu gewinnen, haben E. Schulze und Boßhard[2]) dieselbe mit Barytwasser drei Tage lang auf 150—160° erhitzt. Da das racemische Produkt leichter kristallisiert, so empfiehlt es sich, für solche Versuche das rohe

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **24**, 669.
[2]) Zeitschr. für physiol. Chem. **10**, 135.

Leucin, wie es nach dem üblichen Verfahren aus Horn gewonnen wird, zu verwenden. Bekanntlich enthält dieses Präparat aber als Verunreinigung einen schwefelhaltigen Körper, der gewöhnlich durch Kochen mit Alkali und Bleioxyd entfernt wird. Dasselbe erreicht man mit Bleioxyd allein bei 165°, und gleichzeitig findet dann die Racemisierung des Leucins statt. Daraus ergibt sich folgendes Verfahren für die Darstellung des *dl*-Leucins aus natürlichem Rohmaterial:

40 g eines schwefelhaltigen und noch braun gefärbten Rohleucins werden in 600 ccm heißem Wasser gelöst und mit 40 g gelbem Bleioxyd im Autoklaven 7 Stunden auf 165° erhitzt. Die übel riechende, braune Flüssigkeit wird heiß abfiltriert, der Rückstand noch mehrmals mit Wasser ausgekocht, das vereinigte Filtrat in der Wärme mit Schwefelwasserstoff entbleit und verdampft. Enthält das Rohleucin noch Tyrosin, so ist es nötig, den Rückstand mit siedendem, 25-prozentigem Alkohol auszulaugen, in welchem Tyrosin sehr schwer löslich ist. Die Flüssigkeit wird durch Kochen mit Tierkohle entfärbt und so lange in der Wärme mit absolutem Alkohol versetzt, bis die Kristallisation des racemischen Leucins beginnt. Dasselbe scheidet sich in stark glänzenden Blättchen ab, welche meist zu Büscheln vereinigt sind.

Bei der Qualität unseres Rohleucins betrug die Ausbeute 25 g. Das Produkt war optisch völlig inaktiv und gab folgende Zahlen:

0,2013 g Sbst.: 0,4040 g CO_2, 0,1796 g H_2O.

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92.
Gef. „ 54,73, „ 9,92.

Viel bequemer ist die synthetische Darstellung des *dl*-Leucins. Sie wurde im wesentlichen nach der letzten Vorschrift von Schulze und Likiernik[1]), welche wieder auf den älteren Angaben von Hüfner und Limpricht beruht, ausgeführt, dabei aber die unbequeme Zerlegung der Hydrochlorate mit Bleioxyd in folgender Weise umgangen:

Aus dem durch Eindampfen der salzsauren Lösung gewonnenen Gemisch von Chlorammonium und salzsaurem Leucin läßt sich das letztere leicht mit warmem Alkohol auslaugen. Versetzt man dann die alkoholische Flüssigkeit mit konzentriertem Ammoniak in geringem Überschuß und wäscht den hierbei entstandenen Niederschlag nach dem Abfiltrieren mit kleinen Mengen kalten Wassers, bis das Chlorammonium entfernt ist, so bleibt nahezu reines Leucin zurück. Aus 250 g Valeraldehyd, der durch einmalige Fraktionierung des käuflichen Produktes hergestellt war, wurden so 160 g *dl*-Leucin er-

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. **17**, 513.

halten. Zur völligen Reinigung wird die Aminosäure in heißem Wasser gelöst und durch Zusatz von 1—2 Volumina Alkohol wieder abgeschieden.

Die viel geringere Löslichkeit in Wasser, welche das Präparat im Vergleich zu den aktiven Formen zeigt, spricht entschieden für die Annahme, daß es ein wahrer Racemkörper ist. Dagegen besteht im Schmelzpunkt von aktiver und inaktiver Form kaum ein Unterschied; derselbe wurde im geschlossenen Kapillarrohr und beim raschen Erhitzen nahezu konstant bei 293—295° (korr.) beobachtet. Dabei findet aber Zersetzung und Gasentwickelung statt. Das ist der Grund, warum beim langsamen Erhitzen die Schmelzung schon bei niederer Temperatur eintritt, dann aber viel stärker variiert. So beobachtete Cohn[1]) ebenfalls in geschlossenem Kapillarrohr 275—276°. Die älteren Angaben über den Schmelzpunkt des Leucins, 170°, sind jedenfalls unrichtig.

dl-Benzoylleucin.

Ein Benzoylleucin ist bereits von Destrem[2]) durch Erhitzen von Leucin mit Benzoësäure auf 200° erhalten worden, neben Leucinimid. Leider fehlt die Angabe über den Schmelzpunkt, und da Destrem auch nicht mitteilt, ob er natürliches aktives Leucin oder synthetisches racemisches Produkt verwandt hat, so ist der Vergleich mit den nachfolgenden Körpern nicht möglich.

Für die Darstellung des *dl*-Benzoylleucins diente das bei den Aminosäuren meist recht vorteilhafte Verfahren der Benzoylierung mit einem großen Überschuß von Benzoylchlorid in Gegenwart von Natriumbicarbonat.

20 g *dl*-Leucin wurden in 153 ccm (1 Mol.) Normal-Natronlauge und 400 ccm Wasser gelöst, hierzu 76 g Natriumbicarbonat gegeben und 64 g Benzoylchlorid in kleinen Portionen eingetragen. Nach jedesmaligem Zusatz des Chlorids wurde heftig geschüttelt, bis der Geruch verschwunden war. Die Operation dauerte 4 Stunden. Zum Schluß war die Flüssigkeit durch eine geringe Menge eines Öles getrübt. Sie wurde deshalb mit wenig Tierkohle geschüttelt, filtriert, mit einem Überschuß von Schwefelsäure versetzt und der Kristallbrei, nach zweistündigem Stehen in Eis, filtriert. Das Gemisch von Benzoësäure und Benzoylleucin blieb in dünner Schicht ausgebreitet an der Luft liegen, bis es trocken war, und wurde dann zur Entfernung der Benzoësäure

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. **20**, 205.
[2]) Bull. soc. chim. [2], **30**, 481 (1878).

wiederholt mit größeren Mengen Ligroïn (Sdp. 65—72°) ausgekocht. Der Rückstand löste sich in etwa 20 Teilen warmem Äther, und als die durch Eindampfen etwas konzentrierte Flüssigkeit bis zur beginnenden Trübung mit warmem Ligroïn versetzt war, schied sich beim Abkühlen das Benzoylleucin in farblosen, rhombenähnlichen Platten oder kurzen, zu Drusen vereinigten Prismen ab.

Die Ausbeute an diesem reinen Produkt betrug 70—75% der Theorie. Der Verlust ist zum Teil durch die merkliche Löslichkeit des Körpers in heißem Ligroïn bedingt. Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz verlor bei 110° nicht mehr an Gewicht.

0,2019 g Sbst.: 0,4896 g CO_2 . 0,1347 g H_2O. — 0,2204 g Sbst.: 12,0 ccm N (18°, 752 mm).

$C_{13}H_{17}NO_3$. Ber. C 66,38, H 7,23, N 5,96.
Gef. „ 66,13, „ 7,41, „ 6,23.

Das *dl*-Benzoylleucin schmilzt bei 135—139° (137—141° korr.), d. i. 34° höher als die aktiven Komponenten. In kaltem Wasser ist es sehr schwer löslich, in der Siedehitze verlangt es etwa 200 Teile davon. Beim Abkühlen der wässerigen Lösung scheidet es sich zuerst als Öltropfen ab, welche nach einiger Zeit zu feinen Nadeln oder Blättchen erstarren. Durch Alkohol wird es schon in der Kälte leicht gelöst, ähnlich verhält es sich gegen Äther, Essigester, Aceton, Chloroform und Eisessig. Es kristallisiert aus allen diesen Flüssigkeiten in der Regel in Blättchen, welche häufig sechseckig ausgebildet sind. Als ausgesprochene Säure löst es sich auch leicht in verdünnten Alkalien und Alkalicarbonaten. Kupfer- und Bleisalz sind in Wasser sehr schwer lösliche, feinkörnige Niederschläge; leichter löslich ist das Silbersalz, welches aus heißem Wasser in langen Nadeln kristallisiert.

Die Hauptmenge des *dl*-Benzoylleucins, welches für die nachfolgenden Versuche diente, war aus synthetischem Leucin gewonnen, zum Vergleich wurde aber auch eine andere Probe aus dem racemisierten, natürlichen Produkt bereitet. Ein Unterschied zwischen beiden Präparaten in bezug auf Schmelzpunkt oder die anderen, oben geschilderten Eigenschaften war nicht zu bemerken.

0,2007 g Sbst.: 0,4863 g CO_2 , 0,1316 g H_2O. — 0,2777 g Sbst.: 13,8 ccm N (6°, 757 mm).

$C_{13}H_{17}NO_3$. Ber. C 66,38, H 7,23, N 5,96.
Gef. „ 66,08, „ 7,28, „ 6,03.

Da ferner die Spaltung in die optisch-aktiven Komponenten mit beiden Produkten ganz das gleiche Resultat gab, so glaube ich, ihre Identität gewährleisten zu können.

Benzoyl-*d*-Leucin.

Mit obigem Namen bezeichne ich die in alkalischer Lösung linksdrehende Form des Benzoylleucins, denn sie entspricht derjenigen Form des Leucins, welche in wässeriger Lösung nach rechts dreht und deswegen schon in dem Buche von Landolt: „Das optische Drehungsvermögen", *d*-Leucin genannt wird. Für die praktische Unterscheidung vom natürlichen *l*-Leucin wird man allerdings nicht die wässerige Lösung, welche nur schwach dreht, sondern die salzsaure oder die alkalische Lösung benutzen, und da ist zu beachten, daß diese beiden Lösungen bei der *d*-Verbindung nach links drehen.

Für die Gewinnung des Benzoyl-*d*-Leucins aus dem racemischen Produkt diente, wie schon erwähnt, das Cinchoninsalz.

30 g *dl*-Benzoylleucin und 37,7 g Cinchonin (gleiche Moleküle) werden fein zerrieben und in 3 L siedendem Wasser gelöst. Beim Erkalten scheidet sich zunächst eine kleine Menge des Salzes als zähe Masse ab, dann aber folgen feine, farblose Nadeln. Ihre Menge beträgt nach zwölfstündigem Stehen etwa 25 g. Aus der Mutterlauge gewinnt man noch 5 g, so daß die Gesamtausbeute 88% der Theorie beträgt. Zur Reinigung wird das Salz aus 100 Teilen siedendem Wasser umkristallisiert, wobei die erste Kristallisation, welche ungefähr 60% des gelösten Salzes beträgt, ganz rein ist, während aus der Mutterlauge noch etwa 25% weniger reines Material erhalten werden.

Das Salz bildet farblose, meist zu Büscheln vereinigte Nadeln, welche nicht ganz scharf bei 85° schmelzen. Aus verdünnter Lösung scheidet es sich manchmal bei längerem Stehen in großen, rautenförmigen Blättern oder Prismen ab. In heißem Alkohol ist es sehr leicht löslich und kristallisiert beim Abkühlen in biegsamen Nadeln. Von Äther wird es etwa ebenso leicht, wie von heißem Wasser gelöst.

Zur Gewinnung des Benzoylleucins werden 20 g fein gepulvertes Salz in 500 ccm Wasser suspendiert, mit 50 ccm Normalkali versetzt und auf dem Wasserbade unter kräftigem Schütteln digeriert, bis vom ursprünglichen Salz nichts mehr zu bemerken ist. Man läßt erkalten, filtriert vom Cinchonin, fügt zur Mutterlauge 54 ccm Normal-Salzsäure und verdampft im Vakuum auf etwa 40 ccm. Dabei fällt das Benzoylleucin größtenteils als harzige Masse aus. Dasselbe wird ausgeäthert, die ätherische Lösung konzentriert und bis zur Trübung mit Ligroïn versetzt. Beim völligen Erkalten scheidet sich in der Regel ein dickes Öl ab, das bei starker Abkühlung in einer Kältemischung und beim häufigen Reiben nach ein bis zwei Tagen kristallisiert. Ist man einmal im Besitz der Kristalle, so kann man weitere Kristallisationen durch Impfen außerordentlich beschleunigen. Die kurzen, derben Prismen

enthalten $^1/_2$ Mol. Kristalläther, welcher durch zweistündiges Erwärmen im Vakuum auf 50° bestimmt wurde.

1,4575 g Sbst. verloren 0,1862 g an Gewicht.

$C_{13}H_{17}NO_3 + {}^1/_2\, C_4H_{10}O$. Ber. $C_4H_{10}O$ 13,60. Gef. $C_4H_{10}O$ 12,77.

Bei gewöhnlicher Temperatur entweicht der Äther auch im Vakuum nur unvollständig. Die ätherhaltige Substanz schmilzt unscharf gegen 60°, die ätherfreie Verbindung bei 104—106° (105—107° korr.). Letztere läßt sich auch direkt aus der Lösung in Ätherligroïn durch Einimpfen von ätherfreien Kristallen gewinnen. Zur Lösung bedarf die Verbindung ungefähr 120 Teile kochendes Wasser; beim Erkalten fällt sie daraus zunächst als Öl, das jedoch bald zu kurzen, dicken Prismen erstarrt.

Die vom Äther befreite Substanz gab folgende Zahlen:

0,2003 g Sbst.: 0,4864 g CO_2, 0,1324 g H_2O. — 0,2436 g Sbst.: 12,8 ccm N (17°, 760 mm).

$C_{13}H_{17}NO_3$. Ber. C 66,38, H 7,23, N 5,96.
Gef. „ 66,23, „ 7,34, „ 6,10.

Für die optische Untersuchung diente eine wässerige Lösung, welche etwas mehr als die für ein Molekül berechnete Menge Normalkalilauge enthielt.

0,9924 g Benzoylleucin, 6 ccm Normal-Kalilauge, 11,7305 g Lösung, mithin Prozentgehalt 8,46. Spez. Gewicht 1,036. Temperatur 20°. Drehung im Zweidezimeterrohr bei Natriumlicht —1,12°. Daraus spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20^0} = -6,39^0$ (in alkalischer Lösung).

Ein anderes Präparat, welches aus 4-mal umkristallisiertem Cinchoninsalz dargestellt war, gab $[\alpha]_D^{20^0} = -6,44^0$ (p = 9,57).

d-Leucin.

Erhitzt man die Benzoylverbindung mit der hundertfachen Menge 10-prozentiger Salzsäure am Rückflußkühler, so tritt nach etwa $1^1/_2$ Stunden völlige Lösung des geschmolzenen Benzoylkörper ein, und nach 7 Stunden ist die Hydrolyse beendet. Die Flüssigkeit wurde im Vakuum auf den zwanzigsten Teil eingedampft, dann zur völligen Entfernung der Benzoësäure mehrmals ausgeäthert und nun wieder im Vakuum zur Trockne verdampft. Das zurückbleibende, salzsaure Leucin wurde in der üblichen Weise durch Kochen der wässerigen Lösung mit gelbem Bleioxyd entchlort, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und die Mutterlauge verdampft, bis der größte Teil des Leucins auskristallisiert war. Die abfiltrierte Masse wurde wieder in heißem Wasser gelöst und durch Verdampfen in zwei Kristallfraktionen zerlegt. Für die optische Untersuchung diente die etwa 5-prozentige Lösung in

21-prozentiger Salzsäure. Bestimmung I wurde mit der ersten, Bestimmung II mit der zweiten Fraktion ausgeführt.

I. 0,4275 g Leucin, 9,1492 g Lösung, mithin Prozentgehalt 4,67. Spez. Gewicht 1,10. Temperatur 20°. Drehung im Dezimeterrohr bei Natriumlicht —0,82°. Mithin spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20^0} = -16,00^0$.

II. 0,4320 g Leucin, 9,1282 g Lösung, mithin Prozentgehalt 4,73. Spez. Gewicht 1,10. Temperatur 20°. Drehung im Dezimeterrohr bei weißem Licht —0,88°. Mithin spezifische Drehung $[\alpha]^{20^0} = -16,91^0$.

Da Schulze bei wiederholten Bestimmungen für das natürliche Leucin unter denselben Bedingungen 17,3—17,5° fand, so war die eine Kristallisation fast rein, die andere enthielt noch 7—8% der inaktiven Verbindung. Wie schon früher bemerkt, ist es nicht gelungen, die Racemisierung gänzlich zu vermeiden. Im übrigen zeigte das Präparat ganz die Eigenschaften des Leucins und die Analyse gab stimmende Zahlen:

0,2013 g Sbst.: 0,4032 g CO_2, 0,1785 g H_2O.

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92.
Gef. „ 54,63, „ 9,85.

Das *d*-Leucin ist bisher nur von Schulze und Boßhard[1]) durch partielle Vergärung des inaktiven Körpers mit Penicillium glaucum dargestellt worden. Ihr Verfahren dauert zwar länger, erfordert aber viel weniger Arbeit und ist deshalb für die praktische Gewinnung des Körpers gewiß vorzuziehen, zumal man so auch das Präparat ganz frei von inaktiven Körpern erhalten kann.

Für obige Versuche wurde hauptsächlich *dl*-Benzoylleucin aus synthetischem Leucin verwendet; die ganze Spaltung wurde aber in einem Falle auch mit einem Präparat durchgeführt, welches aus Horn dargestellt und durch Erhitzen mit Bleioxyd auf 165° racemisiert war. Das Resultat war genau das gleiche. Die Kristalle enthielten ebenfalls ½ Mol. Kristalläther.

0,8253 g Sbst. verloren 0,1136 g an Gewicht.

$C_{13}H_{17}NO_3 + \frac{1}{2} C_4H_{10}O$. Ber. $C_4H_{10}O$ 13,60. Gef. $C_4H_{10}O$ 13,76.

0,6554 g Sbst., 4 ccm Normal-Kalilauge, Gewicht der Lösung 7,0150 g, mithin Prozentgehalt 9,34. Temperatur 20°. Spez. Gewicht 1,040. Drehung bei Natriumlicht im Dezimeterrohr —0,62°. Mithin spezifische Drehung

$$[\alpha]_D^{20^0} = -6,38^0.$$

Benzoyl-*l*-Leucin.

Zur Gewinnung desselben dienen die ersten Mutterlaugen vom Cinchoninsalz des optischen Isomeren. Sie werden zunächst mit einem kleinen Überschuß von Normalkalilauge zur Fällung des Cinchonins

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 134.

versetzt, dann das Filtrat mit Normalsalzsäure schwach übersättigt. Läßt man jetzt die Flüssigkeit 12 Stunden stehen, so scheidet sich das noch in Lösung befindliche racemische Benzoylleucin, welches namentlich in kaltem Wasser viel schwerer löslich ist als die aktive Form, zum größten Teile ab. Seine Menge beträgt etwa 20% des angewandten Racemkörpers. Die Mutterlauge wird im Vakuum stark eingedampft, bis der größte Teil des Benzoyl-*l*-Leucins abgeschieden ist. Man gießt dann den Rest der Flüssigkeit weg, löst das abgeschiedene Harz in wenig Alkali und fällt wieder in der Kälte mit Säure; nach kurzer Zeit erstarrt der Niederschlag kristallinisch. Zur völligen Reinigung wird das Produkt in das Chinidinsalz verwandelt.

Zu dem Zweck werden 16 g Benzoylleucin mit 25 g der kristallisierten Base in $4^1/_2$ L heißem Wasser gelöst. Beim Erkalten scheiden sich davon 21 g des Salzes in farblosen, ziemlich dicken Prismen oder rechteckigen Tafeln ab. Die Mutterlauge gibt, in geeigneter Weise konzentriert, noch eine zweite, nicht unbeträchtliche Kristallisation. Zur völligen Reinigung ist es ratsam, das Salz noch einmal aus heißem Wasser umzukristallisieren. Für die Rückverwandlung in Benzoyl-*l*-Leucin diente das bei dem Cinchoninsalz der isomeren Substanz beschriebene Verfahren.

Die Verbindung schmolz, ebenso wie der optische Antipode, im ätherhaltigen Zustand gegen 60° und getrocknet bei 105—107° korr. Sie drehte in alkalischer Lösung nach rechts.

1,0463 g Benzoylleucin, 6 ccm Normal-Kalilauge, 11,9082 g Lösung, mithin Prozentgehalt 8,79%. Spez. Gewicht 1,036. Temperatur 20°. Drehung im Zweidezimeterrohr bei Natriumlicht +1,20°.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D^{20^0} = +6{,}59^0.$$

Die im Vakuum bei 45° getrocknete Substanz gab folgende Zahlen:

0,2011 g Sbst.: 0,4910 g CO_2, 0,1325 g H_2O.

$C_{13}H_{17}NO_3$. Ber. C 66,38, H 7,23.
Gef. „ 66,59, „ 7,32.

Synthetisches *l*-Leucin.

Die Gewinnung aus dem Benzoylkörper geschah genau nach der Vorschrift, welche vorher für die isomere Verbindung gegeben wurde. Das erhaltene Leucin war, wie die Verbrennung zeigte, rein.

0,2010 g Sbst.: 0,4058 g CO_2, 0,1816 g H_2O.

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92.
Gef. „ 55,06, „ 10,04.

Für die optische Bestimmung diente wieder die Lösung in 21-prozentiger Salzsäure.

0,6076 g Sbst.: 13,2778 g Lösung, mithin Prozentgehalt 4,577%. Spez. Gewicht 1,099. Temperatur 20°. Drehung bei Natriumlicht im Zweidezimeterrohr +1,57°.

Mithin spez. Drehung $[\alpha]_D^{20°} = +15,59°$.

Demnach erhielt das Präparat noch ungefähr 11% Racemkörper. Immerhin ist man so imstande, auf rein synthetischem Wege das natürliche aktive Leucin in fast reinem Zustande darzustellen.

Als diese Versuche längst abgeschlossen waren, erschien vor kurzem die Mitteilung von Albert Schultze[1]) über Benzoylleucin. Er erhielt ein inaktives Produkt vom Schmp. 135—140° durch Einwirkung von Benzoylchlorid auf die alkalische Lösung eines Leucins, welches aus Caseïn mit Salzsäure dargestellt war und deshalb die aktive Form gewesen sein muß. Bei dem Versuch von Schultze muß also eine Racemisierung des ursprünglich aktiven Materials stattgefunden haben. Meine erste Angabe[2]) über den Schmelzpunkt des Benzoylleucins, 126 bis 128°, weicht erheblich von obigen Zahlen ab. Das Präparat war aus einem käuflichen Leucin von unbekanntem Herkommen mit Benzoylchlorid und Natriumbicarbonat dargestellt und hatte bei der Analyse ziemlich gut stimmende Zahlen ergeben. Seitdem habe ich wiederholt aktives Leucin aus Horn oder Caseïn, welche möglichst sorgfältig gereinigt waren, und von denen namentlich das aus Caseïn den Eindruck einer reinen Substanz machte, bei Gegenwart von Natriumbicarbonat benzoyliert. Aus dem Produkt, welches nach Entfernung der Benzoësäure zunächst ölig ist, konnte durch Kristallisation nur aktives Benzoyl-*l*-Leucin vom Schmp. 105° isoliert werden. Die Ausbeute an kristallisiertem Material war allerdings wenig befriedigend (20—25% der Theorie), weil die Entfernung der Benzoësäure Schwierigkeiten macht, und weil die Verbindung im unreinen Zustand auch schwer kristallisiert. Racemisches Benzoylleucin wurde hier nicht beobachtet, und wenn es überhaupt entstanden war, so kann seine Menge nicht groß gewesen sein.

Bewerkstelligt man die Benzoylierung des Leucins mit Natronlauge und Benzoylchlorid, so ist das Resultat je nach den angewandten Mengen des letzteren verschieden. Bei den von Schultze empfohlenen Quantitäten, wo das Benzoylchlorid mehr als das Fünffache der theoretischen Menge beträgt, und infolgedessen die Temperatur der Flüssigkeit nicht unerheblich steigt, ist das Hauptprodukt in der Tat racemi-

---

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. **29**, 470.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2454. (*S. 90.*)

sches Benzoylleucin, aber die Mutterlaugen liefern ein niedriger schmelzendes Präparat, welches wahrscheinlich aus der aktiven Form besteht. Beschränkt man dagegen die Menge des Benzoylchlorids auf 3 Moleküle und sorgt dafür, daß die Temperatur nicht über 30° steigt, so hat das Produkt eine ähnliche Beschaffenheit wie bei der Anwendung von Bicarbonat, und es läßt sich daraus aktives Benzoylleucin isolieren. Nach diesen Beobachtungen ist die Racemisierung bei der Bildung des Benzoylleucins durch die Bedingungen der Operation sehr stark beeinflußt.

Inaktives Benzolsulfoleucin,
$(CH_3)_2CH.CH_2.CH(NH.SO_2.C_6H_5).COOH$.

Die Verbindung ist aus dem racemischen Leucin ebenso leicht darzustellen, wie der Benzoylkörper, und da sie fast noch schönere Eigenschaften besitzt wie jener, so ist sie auch zur Identifizierung der Aminosäure recht geeignet. Ich habe sie deshalb nochmals benutzt, um das synthetische Produkt mit dem racemisierten Präparat aus Horn zu vergleichen, und auch hier völlige Übereinstimmung gefunden.

Zur Darstellung werden 5 g Leucin in 40 ccmNormal-Natronlauge gelöst und dann unter dauerndem Schütteln im Laufe von zwei Stunden abwechselnd in kleinen Portionen 21 g Benzolsulfochlorid und 60 ccm einer 22-prozentigen Kalilauge zugesetzt. Der große Überschuß des Chlorids ist, gerade so wie bei der Benzoylierung, für die Ausbeute vorteilhaft. Wenn der Geruch des Chlorids verschwunden ist, scheidet sich beim Ansäuern der Flüssigkeit das Benzolsulfoleucin alsbald kristallinisch ab. Seine Menge betrug 80% der Theorie. Es wird aus siedendem Benzol, von welchem auf 1 g etwa 12 ccm erforderlich sind, umkristallisiert. Zur Vervollständigung der Abscheidung ist Zusatz von Ligroïn förderlich. Das Benzolsulfoleucin wird so in derben Prismen erhalten, welche bei 140° zu sintern beginnen und bei 146° (korr.) schmelzen. Die Verbindung ist in Alkohol, Äther, Aceton, Essigester und Chloroform leicht löslich. Aus kochendem Wasser, von welchem sie etwa 80 Teile verlangt, scheidet sie sich beim Erkalten in schräg zugespitzten Prismen ab. Die Salze mit Alkalien, Ammoniak, ferner mit Kalium und Baryum sind in Wasser leicht löslich und kristallisieren meist in Nadeln. Das Bleisalz ist schwer löslich und bildet mikroskopische Prismen, das Silbersalz ist in heißem Wasser ziemlich leicht löslich und kristallisiert beim Erkalten in feinen, meist kugelförmig vereinigten Nädelchen.

Da die aktiven Formen nicht bekannt sind, so läßt sich nicht sagen, ob die vorliegende Verbindung ein echter Racemkörper oder nur ein Gemisch der optischen Antipoden ist.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 108° getrocknet. Produkt I ist aus synthetischem, Produkt II aus natürlichem, racemisiertem Leucin dargestellt.

0,2012 g Sbst.: 0,3888 g CO_2, 0,1137 g H_2O. — 0,3162 g Sbst.: 14,6 ccm N (20°, 760,5 mm). — 0,2048 g Sbst.: 0,3963 g CO_2, 0,1148 g H_2O.

$C_{12}H_{17}NO_4S$.	Ber.	C 53,14,	H 6,26,	N 5,16.
	Gef.	„ 52,70, 52,77,	„ 6,27, 6,23,	„ 5,29.

Verbindung des *dl*-Leucin mit Phenylcyanat,

$$(CH_3)_2CH.CH_2.\underset{\dot{N}H.CO.NH.C_6H_5}{CH}.COOH$$

Die Verbindung ist so leicht darzustellen und besitzt so schöne Eigenschaften, daß sie ebenso wie Benzoyl- und Benzolsulfokörper zur Erkennung des Leucins dienen kann. Sie wird ähnlich den Derivaten der einfacheren Aminosäuren, welche von Paal beschrieben wurden, durch Schütteln der alkalischen Leucinlösung mit Phenylcyanat erhalten.

1 g *dl*-Leucin wurde in 8 ccm Normal-Kalilauge gelöst und zur stark gekühlten Flüssigkeit in kleinen Portionen 1 g Phenylcyanat zugefügt und jedesmal heftig geschüttelt, bis der Geruch des Cyanats verschwunden war. Die Operation dauerte $^1/_2$ Stunde. Nachdem die Flüssigkeit, welche sich schwach rötlich gefärbt und etwas getrübt hatte, durch Schütteln mit Tierkohle geklärt und entfärbt war, fiel beim Ansäuern eine zähe Masse aus, welche bald kristallinisch erstarrte. Ihre Menge betrug 1,82 g. Sie wurde in warmem Alkohol gelöst und diese Lösung bis zur Trübung mit heißem Wasser versetzt. Beim Erkalten schied sich die Substanz als dicker Brei farbloser Nadeln aus, welche für die Analyse im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

0,2026 g Sbst.: 0,4651 g CO_2, 0,1307 g H_2O. — 0,2150 g Sbst.: 21,2 ccm N (22°, 763 mm).

$C_{13}H_{18}N_2O_3$.	Ber.	C 62,40,	H 7,20,	N 11,20.
	Gef.	„ 62,61,	„ 7,17,	„ 11,21.

Die Verbindung schmilzt unter Gasentwickelung gegen 165° (korr.). Sie verlangt zur Lösung ungefähr 300 Teile kochendes Wasser, von kochendem Alkohol aber nicht mehr als zwei Teile, und kristallisiert aus letzterem in flachen Prismen oder glänzenden Blättchen. In Aceton und Essigester ist sie ebenfalls sehr leicht löslich, und dann sukzessive schwerer in Äther, Chloroform, Benzol und Ligroïn. Das schwer lösliche Silbersalz kristallisiert in Nädelchen.

Derivate der α-Amino-*n*-capronsäure.

Zum Vergleich mit den Derivaten des Leucins schien es wünschenswert, auch Benzoyl- und Benzolsulfo-Verbindung der normalen α-Aminocapronsäure kennen zu lernen.

Als Rohmaterial diente die käufliche Gärungscapronsäure, welche erst fraktioniert, dann mit Brom und Phosphor bromiert und in bekannter Weise amidiert wurde. Für die Bereitung der Derivate wurden dieselben Verfahren wie beim Leucin angewandt.

Benzoyl-α-amino-*n*-capronsäure,

$CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CH(NH.COC_6H_5).COOH$.

Das Produkt wird entweder aus Äther und Ligroïn oder aus heißem Wasser umkristallisiert. Für die Analyse war es im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2009 g Sbst.: 0,4885 g CO_2, 0,1318 g H_2O.

$C_{13}H_{17}NO_3$. Ber. C 66,38, H 7,23.
Gef. „ 66,32, „ 7,28.

Schmelzpunkt nach geringem Sintern 134° (korr.). Die Säure kristallisiert meist in kleinen, länglichen, sechsseitigen Blättchen. Sie ist leicht löslich in Alkalien und Ammoniak; das Baryumsalz ist ebenfalls in kaltem Wasser noch ziemlich leicht löslich und kristallisiert in kleinen Prismen. Das Silbersalz ist in kaltem Wasser schwer, in heißem aber ziemlich leicht löslich und kristallisiert in Blättchen. Kupfer- und Bleisalz sind in Wasser sehr schwer löslich. Über die Spaltung der Säure in die optischen Komponenten, welche Herr Hagenbach in Angriff genommen hat, wird später berichtet.

Benzolsulfo-α-amino-*n*-capronsäure,

$CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CH.(NH.SO_2.C_6H_5).COOH$.

Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 90% der Theorie. Dasselbe wurde in der 10-fachen Menge siedendem Benzol gelöst und durch Zusatz von Ligroïn wieder abgeschieden. Die so erhaltenen, dünnen, meist fächerförmig gruppierten Prismen sinterten etwas bei 120° und schmolzen bei 125° (korr.).

0,2029 g Sbst.: 0,3930 g CO_2, 0,1115 g H_2O.

$C_{12}H_{17}NO_4S$. Ber. C 53,13, H 6,27.
Gef. „ 52,83, „ 6,11.

Aus heißem Wasser kristallisiert sie in farblosen Nadeln. Baryum- und Calciumsalz sind auch in kaltem Wasser ziemlich leicht löslich. Letzteres kristallisiert in feinen Nädelchen. Das Silbersalz ist in heißem Wasser ziemlich leicht löslich und kristallisiert in feinen Nädelchen, welche meist zu kugelförmigen Aggregaten vereinigt sind. Schwer löslich ist das Kupfersalz.

Bei obigen Versuchen bin ich von Herrn Dr. Wolfes aufs eifrigste unterstützt worden, wofür ich demselben besten Dank sage.

---

4. Emil Fischer und A. Mouneyrat: Spaltung einiger racemischer Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten. IV.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **33**, 2383 (1900).
(Eingegangen am 5. August.)

Wie in der zweiten Mitteilung[1]) schon kurz angegeben wurde, gelingt es, das synthetische inaktive Benzoylphenylalanin mit Hilfe des Cinchoninsalzes in die aktiven Komponenten zu spalten. Bei der weiteren Verfolgung dieser Beobachtung ergab sich, daß die eine aktive Benzoylverbindung auf diesem Wege leicht in ganz reinem Zustande gewonnen wird. Durch Abspaltung des Benzoyls läßt sich daraus ein aktives Phenylalanin herstellen, welches bisher unbekannt war und der optische Antipode des von E. Schulze[2]) in Lupinenkeimlingen gefundenen, links drehenden Phenylalanins ist.

Wir nennen dementsprechend die neue Verbindung *d*-Phenylalanin. Das Benzoyl-*l*-Phenylalanin, welches in den Mutterlaugen des Cinchoninsalzes sich befindet, konnte bisher nicht völlig rein erhalten werden, weil kein kristallisiertes Salz mit einer aktiven Base gefunden wurde. Durch fraktionierte Kristallisation gelang es aber, ein Produkt zu isolieren, welches nur noch etwa 20% Racemkörper enthielt.

Die gleiche Spaltungsmethode haben wir ferner auf die α-Aminobuttersäure angewandt und mit Hilfe des Morphin- bzw. Brucinsalzes die beiden aktiven Benzoylkörper sowie die entsprechenden aktiven Aminosäuren, welche beide unbekannt waren, erhalten.

Racemisches Benzoylphenylalanin.

Die Verbindung wurde nach dem schönen Verfahren von Erlenmeyer jun.[3]) dargestellt. Die Reduktion der Benzoylaminozimmtsäure mit der theoretischen Menge 2-prozentigen Natriumamalgams geht recht glatt vonstatten, wenn man während der Operation fortwährend

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 3646. (*S. 117.*)
[2]) Zeitschr. für physiol. Chem. **9**, 85.
[3]) Ann. d. Chem. **275**, 18.

schüttelt und die Reaktion so leitet, daß sie für Mengen von 200 g in 2 Stunden beendet ist. Die Zerstörung der unveränderten Benzoylaminozimmtsäure geschah nach der Vorschrift von Erlenmeyer durch Kochen mit Alkali. Die Ausbeute an reinem Benzoylphenylalanin, über welche Erlenmeyer nichts angibt, betrug bei unseren Reduktionsversuchen 80% der Benzoylaminozimmtsäure.

Der korrigierte Schmelzpunkt des Benzoylphenylalanins liegt bei 187—188°.

Will man aus der Benzoylverbindung das *dl*-Phenylalanin bereiten, so ist es nicht nötig, wie Erlenmeyer vorschreibt, mit Salzsäure auf 150° zu erhitzen. Man erreicht dasselbe durch Kochen der fein gepulverten Substanz mit der 125-fachen Menge 10-prozentiger Salzsäure am Rückflußkühler, wobei nach 2—3 Stunden Lösung und nach etwa 8 Stunden völlige Spaltung eintritt.

Benzoyl-*d*-Phenylalanin.

Wie schon erwähnt, gelingt die Spaltung des racemischen Produktes mit Cinchonin, welches mit dem Benzoyl-*d*-Phenylalanin das schwerer lösliche Salz bildet. Da die Kristallisation desselben einige Schwierigkeiten bietet, so ist es ratsam, den Versuch zuerst im kleinen auszuführen. Man löst zu dem Zweck 1,4 g Cinchonin und 1,3 g Benzoylphenylalanin in 350 ccm kochendem Wasser. Beim Abkühlen trübt sich die Flüssigkeit und scheidet eine kleine Menge eines bräunlich gefärbten Sirups ab. Nach völligem Erkalten läßt man die abgegossene klare Lösung im Eisschrank mehrere Tage stehen und verteilt die allmählich erscheinenden Kriställchen durch häufiges Umrühren in der Flüssigkeit. Ist man auf diese Weise in den Besitz von Impfmaterial gelangt, so wird der Versuch mit 14,8 g Cinchonin, 13,4 g Benzoylphenylalanin und $3^1/_2$ L Wasser wiederholt und die abgekühlte dekantierte Lösung bei Zimmertemperatur mit den Kristallen versetzt. Beschleunigt man dann durch häufiges Umrühren die Kristallisation, so erhält man nach 12 Stunden ungefähr 9 g oder $^2/_3$ der Theorie des kristallisierten Salzes. Eine weitere, aber nicht beträchtliche Kristallisation gewinnt man durch Eindampfen der Mutterlauge im Vakuum bis zur Abscheidung eines Sirups und längeres Stehenlassen nach Einimpfen einiger Kriställchen. Das zuerst ausgeschiedene Salz wird durch zweimalige Kristallisation aus der hundertfachen Menge heißen Wassers ganz rein erhalten, wobei der Verlust sehr gering ist, und bildet dann lange, farblose Nadeln vom Schmp. 180—181° (unkorrigiert).

Um das Salz zu zerlegen, löst man 15 g in 2 L kochendem Wasser, fügt 48 ccm Normal-Natronlauge hinzu, kühlt auf 0° ab, filtriert das ge-

fällte Cinchonin und versetzt die Mutterlauge mit 60 ccm Normal-Salzsäure. Dabei scheidet sich der größte Teil des Benzoyl-*d*-phenylalanins als farblose, leichte, mikrokristallinische Masse ab. Da aber ein nicht unbeträchtlicher Teil der Verbindung in den Mutterlaugen bleibt, so ist es nötig, dieselben im Vakuum auf dem Wasserbade stark einzudampfen, wobei eine zweite Kristallisation erfolgt. Die Ausbeute ist fast quantitativ. Zur vollständigen Reinigung wird die Substanz aus der zweihundertfachen Menge kochendem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert. Sie bildet dann schöne, farblose Nadeln, welche bei 142—143° (korr. 145—146°), mithin erheblich niedriger als der Racemkörper, schmelzen.

Für die Analyse wurde sie bei 100° getrocknet.

0,2066 g Sbst.: 9,6 ccm N (21°, 754 mm). — 0,2008 g Sbst.: 0,5236 g CO_2, 0,1020 g H_2O.

$C_{16}H_{15}O_3N$. Ber. C 71,4, H 5,61, N 5,20.
Gef. „ 71,1, „ 5,64, „ 5,25.

Für die optische Bestimmung diente die alkalische Lösung, da die Substanz in Wasser zu wenig löslich ist.

Gewicht der Gesamtlösung 11,939 g, enthaltend 0,756 g Benzoyl-*l*-Phenylalanin und 3 ccm Normal-Kalilauge; spez. Gewicht 1,022; Drehung bei 20° im 2-Dezimeterrohr bei Natriumlicht 2,21°.

Mithin $[\alpha]_D^{20°} = -17,1°$ (für die alkalische Lösung).

d-Phenylalanin.

Wird die Benzoylverbindung mit der 120-fachen Menge 10-prozentiger Salzsäure auf dem Wasserbade unter öfterem Umschütteln erhitzt, so löst sie sich im Laufe von etwa 4 Stunden, und nach weiterem 6-stündigen Erhitzen ist die Zersetzung beendet. Nach dem Erkalten wird die Benzoësäure ausgeäthert, die salzsaure Lösung im Vakuum und zum Schluß in einer Schale auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, dann der Rückstand in der 4-fachen Menge Wasser gelöst und mit einer konzentrierten Lösung von Natriumacetat das Phenylalanin ausgefällt. Zur völligen Reinigung löst man die filtrierte Kristallmasse in der 25-fachen Menge heißem Wasser, entfärbt mit Tierkohle und verdampft das Filtrat größtenteils auf dem Wasserbade, wobei das Phenylalanin in schönen Blättchen kristallisiert.

Dieselben wurden für die Analyse bei 100° getrocknet.

0,1709 g Sbst.: 12,5 ccm N (19°, 763 mm). — 0,2018 g Sbst.: 0,4835 g CO_2, 0,1212 g H_2O.

$C_9H_{11}NO_2$. Ber. C 65,42, H 6,66, N 8,48.
Gef. „ 65,34, „ 6,66, „ 8,44.

Die Verbindung schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr unter starker Gasentwickelung bei 283—284° (korr.), mithin ungefähr bei derselben Temperatur wie der Racemkörper, dagegen ist sie in Wasser leichter löslich als dieser. 1 Teil *d*-Phenylalanin verlangt 35,3 Teile Wasser bei 16°.

Für die optische Untersuchung diente die wässerige Lösung.

Gewicht der Lösung 13,633 g. Gewicht der Substanz 0,2768 g. Spez. Gewicht 1,0043. Prozentgehalt 2,03. Temperatur 16°. Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr +1,43°.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D^{16^\circ} = +35{,}08^\circ.$$

Schulze[1]) fand unter den gleichen Bedingungen für den optischen Antipoden oder das natürliche Phenylalanin, $[\alpha]_D^{16} = -35{,}3^\circ$. Die Differenz liegt innerhalb der Versuchsfehler.

Viel geringer ist die Drehung einer Lösung des *d*-Phenylalanins in 18-prozentiger Salzsäure.

Gewicht der Lösung 18,0239 g. Gewicht der Substanz 0,6311 g. Spez. Gewicht 1,0895. Prozentgehalt 3,5%. Temperatur 20°. Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr +0,54°.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D^{20^\circ} = +7{,}07^\circ.$$

Zur weiteren Charakterisierung des *d*-Phenylalanins wurde noch seine Verbindung mit Phenylisocyanat untersucht, welche wir

Phenylisocyanat-*d*-Phenylalanin,

$$C_6H_5.CH_2.CH.COOH$$
$$\qquad\qquad NH.CO.NH.C_6H_5\text{ ,}$$

nennen.

Zur Bereitung derselben wurden 0,5 g *d*-Phenylalanin in 4 ccm Normal-Natronlauge gelöst und zu der sehr stark gekühlten Flüssigkeit allmählich 0,4 g Phenylisocyanat unter starkem Schütteln zugesetzt. Beim Ansäuern der filtrierten Lösung fiel die neue Verbindung als farblose Masse aus, welche aus 250 ccm kochendem Wasser umkristallisiert wurde. Die schönen, farblosen Nadeln wurden für die Analyse bei 100° getrocknet.

0,2021 g Sbst.: 0,5012 g CO_2, 0,1056 g H_2O.

$C_{16}H_{16}O_3N_2$. Ber. C 67,60, H 5,63.
Gef. „ 67,63, „ 5,80.

Die Verbindung schmilzt bei 180—181° (korr.) und ist in kaltem Wasser, Äther und Ligroïn fast unlöslich, dagegen löst sie sich leicht

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. **9**, 85.

in heißem Alkohol. Bemerkenswert ist das starke Drehungsvermögen der alkalischen Lösung.

Gesamtgewicht der Lösung 4,4754 g. Gewicht der Substanz 0,3744 g. Prozentgehalt 8,36%. Spez. Gewicht 1,035. Temperatur 20°. Drehung bei Natriumlicht im 1-Dezimeterrohr 5,3° nach links.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D^{20^\circ} = -61{,}27^\circ.$$

Benzoyl-*l*-Phenylalanin.

Dasselbe befindet sich in den Mutterlaugen, aus welchen das Cinchoninsalz des optischen Antipoden ausgefallen ist. Fällt man dieselben mit Alkali und übersättigt die vom Cinchonin abfiltrierte Lösung mit Salzsäure, so entsteht ein reichlicher Niederschlag von feinen Nadeln, welcher hauptsächlich aus racemischem Benzoylphenylalanin besteht, da der aktive Körper in kaltem Wasser leichter löslich ist. Werden die Mutterlaugen durch Eindampfen im Vakuum stark konzentriert, so resultiert eine neue reichliche Kristallisation, welche viel aktives Benzoylphenylalanin, allerdings neben Racemkörper, enthält. Zur annähernden Trennung derselben kocht man das gepulverte Produkt mit der 35-fachen Menge Wasser, wobei der schwerer lösliche Racemkörper teilweise zurückbleibt, und überläßt das Filtrat der Kristallisation. Wir erhielten so farblose Nadeln, welche keinen scharfen Schmelzpunkt hatten und nach der optischen Bestimmung ein Gemisch von Benzoyl-*l*-phenylalanin mit ungefähr 20% Racemkörper waren. Es ist uns leider nicht gelungen, ein kristallisiertes Salz mit einer aktiven Base darzustellen und dadurch die völlige Reinigung zu erzielen. Durch Spaltung mit Salzsäure gewinnt man aus diesem Produkt natürlich ein noch unreines *l*-Phenylalanin.

Darstellung der inaktiven α-Aminobuttersäure.

Die Verbindung ist bereits von Schneider sowie Friedel und Machuca[1]) beschrieben; es scheint uns aber nützlich, ihre kurzen Angaben durch Mitteilung der Erfahrungen, welche wir bei der Bereitung größerer Mengen machen konnten, zu ergänzen.

Als Ausgangsmaterial diente die käufliche Gärungsbuttersäure, nachdem ein Kontrollversuch mit ganz reiner Normalbuttersäure genau das gleiche Resultat gegeben hatte. Das Kahlbaum'sche Präparat wurde zunächst fraktioniert, wobei nur ein geringer Verlust eintrat, und dann nach dem Verfahren von Hell-Volhard-Zelinsky bromiert. Derselbe Versuch ist schon von Auwers[2]) ausgeführt, das Pro-

---

[1]) Ann. d. Chem. Suppl. **2**, 71.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **24**, 2220.

dukt aber nicht auf Brombuttersäure, sondern auf Äthylester verarbeitet worden.

Wir verwandten in einer Operation 250 g Buttersäure, 35 g roten Phosphor und 880 g trocknes Brom und brauchten dafür ungefähr 3 Stunden. Zum Schluß, als die Reaktion sich verzögerte, wurde der Kolben auf dem Wasserbade erwärmt. Die braun gefärbte Lösung wurde dann in 1 L heißes Wasser, welches durch einen Rührer lebhaft bewegt war, im Laufe von einer Stunde eingetropft, nach dem völligen Erkalten vom ausgeschiedenen Öl abgegossen und dreimal mit $^1/_2$ L Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten ätherischen Auszüge wurden über Chlorcalcium getrocknet, verdampft und der Rückstand im Vakuum destilliert. Bei 25 mm Druck wurden erhalten:

70—115° 20 g (hauptsächlich unveränderte Buttersäure),
127—128° 365 g Brombuttersäure,
über 138° 25 g (wahrscheinlich höher bromierte Produkte).

Die Ausbeute an Monobrombuttersäure betrug also 80% der Theorie.

Zur Umwandlung in die Aminosäure werden 100 g der Brombuttersäure in kleinen Portionen und unter guter Kühlung in 400 g wässerige, bei 0° gesättigte Ammoniaklösung eingetragen, diese klare Lösung in geschlossenen Röhren 6 Stunden auf 100° erhitzt und dann die gelb gefärbte Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation verdampft. Zur Isolierung der Aminosäure ist die von den früheren Autoren empfohlene Entfernung der Ammoniumsalze durch Kochen mit Bleioxyd recht unbequem. Viel rascher gelangt man auf folgende Weise zum Ziel.

Die eben erwähnte, konzentrierte Lösung wird mit dem fünffachen Volumen Alkohol (95-proz.) versetzt und dann 2 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Dabei scheidet sich die in Alkohol schwer lösliche Aminosäure als schöne, glänzende Blättchen ab, während das Bromammonium hauptsächlich in der Mutterlauge bleibt. Zur vollständigen Reinigung genügt es, dieses Produkt mehrmals in der vierfachen Menge Wasser zu lösen und in der gleichen Weise durch Alkohol zu fällen.

Die Ausbeute betrug 28% der angewandten Brombuttersäure. Weitere 4% lassen sich aus den alkoholischen Mutterlaugen gewinnen. Man verdampft dieselben bis zur beginnenden Kristallisation, fällt wieder mit Alkohol und reinigt den Niederschlag, wie oben angegeben. Um den letzten Rest (3%), welcher in der Mutterlauge bleibt, zu isolieren, neutralisiert man mit Salzsäure, verdampft zur Trockne und laugt den Rückstand mit wenig kochendem, absolutem Alkohol aus, worin das

Hydrochlorat der Aminosäure leicht löslich ist, während das Bromammonium größtenteils zurückbleibt. Der beim Verdampfen des Alkohols bleibende Rückstand wird dann mit Wasser und Bleioxyd gekocht, bis kein Ammoniak mehr entweicht, das Filtrat entbleit und zur Trockne verdampft. Die Gesamtausbeute betrug 35% der angewandten Brombuttersäure oder 57% der Theorie. Die Nebenprodukte der Reaktion haben wir nicht untersucht.

Im offenen Kapillarrohr verflüchtigt sich die α-Aminobuttersäure, ohne zu schmelzen, oberhalb 300°, im verschlossenen Kapillarrohr schmilzt sie beim raschen Erhitzen unter starker Gasentwickelung und Gelbfärbung gegen 307° (korr.). Die Aminobuttersäure gibt in wässeriger Lösung mit Kupferacetat das schon von Heintz erwähnte, schwer lösliche Kupfersalz und mit Eisenchlorid eine dunkel braunrote Färbung.

Racemische Benzoyl-α-Aminobuttersäure,

$$CH_3.CH_2.\underset{\dot{N}H.COC_6H_5}{CH}.COOH$$

30 g Aminobuttersäure wurden in 300 g Wasser gelöst und nach Zugabe von 220 g Natriumbicarbonat bei gewöhnlicher Temperatur unter fortwährendem Schütteln 180 g Benzoylchlorid in kleinen Portionen und im Laufe von 2 Stunden zugesetzt. Gegen Ende der Operation wurden noch 30 ccm Natronlauge (von 33%) ebenfalls in kleinen Portionen abwechselnd mit dem Benzoylchlorid zugegeben, so daß zum Schluß der Geruch des letzteren vollständig verschwand. Beim Ansäuern der filtrierten Lösung fiel ein Gemenge von Benzoësäure und Benzoylaminobuttersäure aus, welche nach dem Trocknen durch Auskochen mit Ligroïn getrennt wurden. Zum Schluß wurde die Benzoylaminobuttersäure aus der 25-fachen Menge heißem Wasser umkristallisiert.

Die Ausbeute betrug auffallenderweise nur 50% der Theorie.

Für die Analyse war die Substanz bei 100° getrocknet.

0,218 g Sbst.: 13,4 ccm N (25°, 762,5 mm). — 0,2031 g Sbst.: 0,4747 g CO_2, 0,1157 g H_2O.

$C_{11}H_{13}O_3N$. Ber. C 63,76, H 6,28, N 6,76.
Gef. „ 63,74, „ 6,33, „ 6,87.

Die Substanz beginnt beim Erhitzen gegen 140° zu sintern und schmilzt bei 143—144° (korr. 145—146°).

Sie löst sich in 225 Teilen Wasser von 20°, in der Siedehitze ist sie ungefähr 5 mal leichter löslich. Sie löst sich ferner sehr leicht in Alkohol, Aceton, Eisessig und Chloroform. Auch von Benzol, Nitrobenzol

und Anilin wird sie in der Hitze leicht, in der Kälte aber nur wenig gelöst. Schwer löslich ist sie in Äther und fast unlöslich in Ligroïn.

Mit Kupferacetat gibt sie in wässeriger Lösung ein hübsch kristallisiertes, grünes Salz.

Racemische α-Benzolsulfoaminobuttersäure.

Man löst 2 g Aminosäure in 20 ccm Normal-Natronlauge und fügt abwechselnd in kleinen Portionen 10 g Benzolsulfochlorid und 100 ccm Normal-Natronlauge im Laufe von einer Stunde hinzu. Während der Operation muß die Flüssigkeit fortwährend geschüttelt werden. Wenn der Geruch des Chlorids verschwunden ist, fällt man mit überschüssiger Salzsäure, kühlt auf 0° ab und kristallisiert den abgesaugten Niederschlag aus ungefähr 120 ccm kochendem Wasser. Die Ausbeute betrug 80% der Theorie.

Für die Analyse war die Substanz bei 100° getrocknet.

0,2019 g Sbst.: 0,3654 g CO_2, 0,0992 g H_2O.

$C_{10}H_{13}O_4NS$. Ber. C 49,38, H 5,35.
Gef. „ 49,36, „ 5,50.

Die Verbindung schmilzt bei 145—146° (korr. 148—149°) ohne Zersetzung und gleicht in der Löslichkeit dem zuvor beschriebenen Benzoylderivat.

d-Benzoyl-α-Aminobuttersäure.

41 g *dl*-Benzoylaminobuttersäure und 60 g Morphin werden in 125 g heißem Wasser gelöst. Wird dann auf 0° abgekühlt und die Wandung des Gefäßes öfter mit einem Glasstabe gerieben, so beginnt nach einigen Stunden die Kristallisation. Sorgt man durch häufiges Umrühren für Verteilung der Kristalle in der dicklichen Flüssigkeit, so sind bei 0° nach etwa 15 Stunden 39 g derselben abgeschieden. Sie wurden abgesaugt und mit wenig Eiswasser gewaschen. Die Mutterlauge, auf etwa drei Viertel ihres ursprünglichen Volumens eingedampft, gibt eine zweite Kristallisation von etwa 7 g. Zur Reinigung wird das Morphinsalz noch viermal aus heißem Wasser umkristallisiert, wobei man immer an Wasser $^5/_4$ vom Gewichte des Salzes nimmt. Dabei verliert man ungefähr die Hälfte der ersten Kristallisation, so daß die Ausbeute an reinem Salz etwa 40% der Theorie beträgt. Das Salz bildet ziemlich große, spießige Kristalle, welche bei 100° getrocknet den Schmp. 145 bis 146° (unkorr.) zeigten.

Um daraus die aktive α-Benzoylaminobuttersäure zu gewinnen, löst man in der 12-fachen Menge Wasser, kühlt auf 0° ab und fügt so

ange eine Lösung von Ammoniumcarbonat hinzu, als noch eine Fällung erfolgt. Das Morphin wird filtriert und die Mutterlauge mit einem geringen Überschuß von Salzsäure versetzt. Dabei fällt der größere Teil der aktiven Benzoylaminobuttersäure aus, den Rest gewinnt man durch Eindampfen der Mutterlauge im Vakuum. Das Produkt wird einmal aus heißem Wasser umkristallisiert.

Für die Analyse war es bei 100° getrocknet.

0,2104 g Sbst.: 12,7 ccm N (20°, 762 mm). — 0,2016 g Sbst.: 0,4717 g CO_2, 0,1152 g H_2O.

$C_{11}H_{13}O_3N$. Ber. C 63,76, H 6,28, N 6,76.
Gef. „ 63,80, „ 6,35, „ 6,90.

Die Substanz schmilzt bei 120—121° (korr.), mithin erheblich niedriger als der Racemkörper; sie ist auch in Wasser leichter löslich, denn bei 20° verlangt sie davon nur 93 Teile. Desgleichen wird sie von anderen Lösungsmitteln durchgehends leichter aufgenommen. Für die optische Bestimmung diente eine wässerige Lösung, welche mit der für 1 Molekül berechneten Menge Natronlauge hergestellt war.

Gewicht der Lösung 14,3061 g, Gewicht der Substanz 1,1 g, spez. Gewicht 1,0391, Prozentgehalt 7,68%, Temperatur 20°, Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr 4,9°.

Mithin in alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20^0} = +30,7^0$.

Eine zweite Bestimmung unter denselben Bedingungen gab +30,8°.

d-*α*-Aminobuttersäure.

Die Benzoylverbindung wird mit der fünffachen Menge 10-prozentiger Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, die Lösung nach dem Erkalten ausgeäthert und auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, wobei das Chlorhydrat der Aminobuttersäure als schwach braun gefärbte Kristallmasse resultiert. Dasselbe läßt sich durch Lösen in absolutem Alkohol unter Zusatz von einigen Tropfen alkoholischer Salzsäure und Fällen mit Äther in feinen, farblosen Nadeln gewinnen, welche für die Analyse bei 100° getrocknet wurden.

0,2032 g Sbst.: 0,2095 g AgCl.

$C_4H_{10}O_2NCl$. Ber. Cl 25,45. Gef. Cl 25,45.

Das Salz ist in Wasser sehr leicht löslich und dreht nach rechts.

Gesamtgewicht der Lösung 15,6917 g, Gewicht der Substanz 0,7801 g, spez. Gewicht 1,0201, Prozentgehalt 4,97%, Temperatur 20°, Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr +1,46°.

Mithin $[\alpha]_D^{20^0} = +14,51^0$.

Um aus dem Salz die freie Aminosäure darzustellen, löst man in ungefähr 70 Teilen Wasser und kocht mehrere Stunden mit einem großen Überschuß von gelbem Bleioxyd, bis eine Probe keine Chlorreaktion mehr gibt. Das Filtrat wird dann mit Schwefelwasserstoff gefällt, mit Tierkohle aufgekocht, die farblose Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation verdampft und mit Alkohol versetzt. Dabei fällt die Aminosäure in sehr feinen, farblosen Blättchen. Die Ausbeute ist nahezu theoretisch. Für die Analyse wurde bei 100° getrocknet.

0,2037 g Sbst.: 0,3494 g CO_2, 0,1604 g H_2O. — 0,2017 g Sbst.: 24 ccm N (24°, 766 mm).

$C_4H_9NO_2$. Ber. C 46,60, H 8,73, N 13,59.
Gef. „ 46,78, „ 8,75, „ 13,45.

Im geschlossenen Kapillarrohr schmilzt sie unter Zersetzung gegen 303° (korr.), mithin nur wenige Grade niedriger als der Racemkörper. In wässeriger Lösung gibt sie mit Kupferacetat ähnlich dem Racemkörper ein schwer lösliches, blaues Kupfersalz. Die wässerige Lösung dreht nach rechts.

0,738 g Sbst.: Gesamtgewicht der Lösung 13,6546 g. Mithin Prozentgehalt 5,406%. Spez. Gewicht 1,0102. Temperatur 20°. Drehung im 2-Dezimeterrohr bei Natriumlicht + 0,87°. Mithin spez. Drehung in wässeriger Lösung

$$[\alpha]_D^{20^0} = +8,0^0.$$

Zur Prüfung auf Reinheit wurde die Substanz in derselben Weise wie der Racemkörper benzoyliert und die Benzoylverbindung, in Wasser mit der äquivalenten Menge Natronlauge gelöst, für die optische Bestimmung benutzt.

Eine Lösung von 4,47% gab, im Dezimeterrohr bei 20° geprüft, die spezifische Drehung + 29°, während eine Kontrollprobe mit ganz reiner *d*-Benzoylaminobuttersäure unter den gleichen Bedingungen +29,35° zeigte. Die kleine Abweichung von dem früher gegebenen Werte ist wohl durch die geringere Konzentration der Lösung bedingt.

l-Benzoyl-α-Aminobuttersäure.

Für die Bereitung der Säure dient entweder der Racemkörper, oder noch besser, die Mutterlauge von der Kristallisation des Morphinsalzes. Sie wird zunächst zur Entfernung des Morphins mit Ammoniumcarbonat gefällt und das Filtrat mit Salzsäure angesäuert. Dabei fällt ein Gemisch von linksdrehender und racemischer Benzoylaminobuttersäure aus; den in der Lösung verbleibenden Rest gewinnt man durch Ver-

dampfen im Vakuum. Die vereinigten Produkte werden durch einmalige Kristallisation aus heißem Wasser gereinigt.

Für die Bereitung des Brucinsalzes, welches die Isolierung der Linksverbindung ermöglicht hat, löst man 50 g der gepulverten Säure mit 112 g Brucin in 190 g kochendem Wasser und überläßt die sirupöse und schwach bräunliche Lösung im Eisschrank der Kristallisation. Diese läßt sich durch Impfung sehr beschleunigen und ist dann nach 24 Stunden in der Regel beendet. Das ausgeschiedene Produkt wird abgesaugt und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Zur völligen Reinigung ist nochmalige Kristallisation aus heißem Wasser unter denselben Bedingungen wie beim Morphinsalz nötig. Dabei entstehen so große Verluste, daß die schließliche Ausbeute nicht mehr als 25% der Theorie beträgt. Das reine Salz bildet ziemlich große, durchsichtige Kristalle, welche, über Schwefelsäure getrocknet, bei 86—87° schmelzen.

Zur Gewinnung der freien Säure löst man 20 g des Salzes in 200 g Wasser, fällt mit 30 ccm Normal-Natronlauge, kühlt auf 0° ab, filtriert und versetzt die Flüssigkeit mit 31 ccm Normal-Salzsäure. Der größte Teil der Benzoylverbindung wird dabei gefällt, den Rest gewinnt man durch Verdampfen der Mutterlauge im Vakuum. Zur völligen Reinigung genügt einmaliges Umkristallisieren aus Wasser.

Die Substanz wurde für die Analyse bei 100° getrocknet.

0,1883 g Sbst.: 11,6 ccm N (19°, 755 mm). — 0,2018 g Sbst.: 0,4719 g CO_2, 0,115 g H_2O.

$C_{11}H_{13}NO_3$. Ber. C 63,76, H 6,28, N 6,76.
Gef. „ 63,74, „ 6,33, „ 7,03.

Die Substanz zeigt denselben Schmelzpunkt, die gleiche Löslichkeit und dieselbe äußere Form der Kristalle, wie der optische Antipode, sie dreht aber in alkalischer Lösung nach links.

Gewicht der Lösung 13,803 g, spez. Gewicht 1,0392, Gewicht der Substanz 1 g, Prozentgehalt 7,25, Temperatur 20°. Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr —4,80°.

Mithin $[\alpha]_D^{20^\circ} = -31,8^\circ$,

während für die *d*-Verbindung +30,68° gefunden wurde.

l-α-Aminobuttersäure.

Sie wurde genau so dargestellt, wie die *d*-Verbindung, und zeigte mit Ausnahme der Drehung ganz die gleichen Eigenschaften.

Für die freie Säure wurde gefunden in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20^\circ} = -7,92^\circ$ bei 5,31% Gehalt.

Gewicht der Lösung 16,643 g, spez. Gewicht 1,009, Gewicht der Substanz 0,8836 g, Temperatur 20°. Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr —0,85°.

Das salzsaure Salz gab in wässeriger Lösung bei 4,77% Gehalt $[\alpha]_D^{20°} = -14,34°$.

Gewicht der Lösung 11,4952 g, spez. Gewicht 1,0202, Gewicht der Substanz 0,549 g, Temperatur 20°. Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr —1,40°.

Die Abweichungen von den Werten, welche bei den *d*-Verbindungen gefunden wurden, liegen innerhalb der Versuchsfehler.

5. Emil Fischer und Rudolf Hagenbach: Spaltung racemischer Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten. V.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **34**, 3764 (1901).
(Eingegangen am 29. Oktober.)

Den früher[1]) behandelten Fällen ist die Zerlegung der racemischen α-Amino-Normal-Capronsäure anzureihen. Ihre Benzoylverbindung wird durch Kristallisation des Cinchoninsalzes aus Wasser leicht gespalten, und die beiden optisch-isomeren Formen konnten in reinem Zustande isoliert werden. Diejenige, welche das schwer lösliche Cinchoninsalz bildet, dreht das polarisierte Licht in alkalischer Lösung stark nach links und entspricht der einzigen, bisher bekannten, aktiven α-Amino-*n*-Capronsäure, die Schulze und Likiernik[2]) aus der Racemverbindung durch partielle Vergärung erhielten, und die in salzsaurer Lösung ebenfalls nach links dreht. Wir bezeichnen sie deshalb als *l*-Verbindung. Leider wird bei der Rückverwandlung der Benzoylverbindung in die Aminosäure ein kleiner Teil racemisiert, so daß es auf diesem Wege nicht möglich ist, ganz reine aktive Säure zu gewinnen. Die Verhältnisse liegen also hier ganz ähnlich wie bei dem Leucin.

l-Benzoyl-α-Amino-*n*-capronsäure.

5 Teile racemische Benzoyl-α-Amino-capronsäure[3]) werden mit 6,25 Teilen kristallisiertem käuflichem Cinchonin in 750 Teilen kochendem Wasser gelöst. Bei längerem Stehen der erkalteten Flüssigkeit und öfterem Reiben der Glaswandung kristallisiert das Salz der linksdrehenden Benzoylverbindung. Durch Einimpfen einiger Kristalle kann diese Operation sehr beschleunigt werden. 15—20 Stunden nach Eintritt der Kristallisation war nach öfterem Umrühren die Abscheidung des Salzes beendet. Es wurde filtriert und aus der 70-fachen Menge Wasser umkristallisiert. Die Menge des reinen Salzes betrug in der Regel 3 Teile

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2451, 3638 [1899] und **33**, 2370, 2383 [1900].
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **17**, 523 [1893].
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2382 [1900]. (*S. 130.*)

oder 54% der Theorie. Auf die Verarbeitung der Mutterlaugen kommen wir gleich zurück. Zur Gewinnung der freien Benzoylverbindung werden 10 g fein zerriebenes Cinchoninsalz mit 250 ccm Wasser und 40 ccm Normal-Kalilauge etwa $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbade digeriert, nach dem Erkalten vom Cinchonin abfiltriert und die Lösung mit 50 ccm Normal-Salzsäure versetzt. Nach kurzer Zeit beginnt die Kristallisation der aktiven Benzoylverbindung. Die Mutterlaugen liefern nach dem Einengen unter vermindertem Druck eine zweite Kristallisation.

Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Durch Umkristallisieren aus heißem Wasser wird der Benzoylkörper in schönen, langen, farblosen Nadeln erhalten. Dieselben enthalten im lufttrockenen Zustande $^1/_2$ Mol. Kristallwasser, welches schon im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure zum Teil entweicht, wobei die Masse klebrig wird. Für die Bestimmung des Kristallwassers wurde bei 100° getrocknet.

0,1829 g verloren 0,0062 g, wobei die Masse völlig zusammensinterte.

$^1/_2$ H_2O. Ber. 3,55. Gef. 3,39.

Die kristallwasserhaltige Substanz schmilzt bei 53° (korr.). Das getrocknete Präparat gab folgende Zahlen:

0,1767 g Sbst.: 0,4305 g CO_2, 0,1180 g H_2O.

$C_{13}H_{17}NO_3$. Ber. C 66,39, H 7,23.
Gef. „ 66,44, „ 7,42.

Für die optische Bestimmung wurden 1,0672 g kristallwasserhaltige Substanz in 5 ccm Normal-Kalilauge (etwas mehr als die molekulare Menge) und ca. 6 ccm Wasser gelöst.

Gesamtgewicht der Flüssigkeit 11,2018 g, mithin Prozentgehalt 8,88; spez. Gewicht 1,027; Drehung bei 20° im 1-Dezimeterrohr und Natriumlicht 2° nach links. Mithin für die kristallwasserhaltige Verbindung in alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20°} = -21,9°$.

Da auch nach öfterem Umkristallisieren des Cinchoninsalzes dieser Wert konstant blieb, so glauben wir, daß die aktive Benzoylverbindung ganz frei von Racemkörper war. Sie ist in Alkohol zerfließlich, in Äther auch ziemlich leicht, in Ligroïn dagegen äußerst schwer löslich; beim Erwärmen mit Wasser schmilzt sie und löst sich beim Kochen in ungefähr 80 Teilen.

l-α-Amino-*n*-capronsäure.

Wird die Benzoylverbindung mit der 150-fachen Mengen zehnprozentiger Salzsäure am Rückflußkühler gekocht, so ist die Zersetzung nach 6 Stunden beendet. Nach dem Erkalten wird von der ausgeschiedenen Benzoësäure filtriert, die Lösung unter vermindertem Druck

stark eingeengt, mehrmals ausgeäthert, dann zur Trockne verdampft und das zurückbleibende Hydrochlorat in der üblichen Weise durch Kochen mit gelbem Bleioxyd zerlegt. Die so gewonnene freie Aminosäure kristallisiert aus heißem Wasser in farblosen, glänzenden, dem Leucin ähnlichen Blättchen, die im verschlossenen Kapillarrohr beim raschen Erhitzen gegen 296⁰ schmelzen, während im offenen Kapillarrohr zwischen 260⁰ und 270⁰ Zersetzung ohne deutliche Schmelzung erfolgt.

Zur Analyse wurde das Präparat bei 120⁰ getrocknet:

0,1793 g Sbst.: 0,3599 g CO_2, 0,1606 g H_2O.

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92.
Gef. „ 54,74, „ 9,95.

Für die optische Bestimmung diente die Lösung in 20-prozentiger Salzsäure. Gewicht der Substanz 0,4890 g, Gewicht der Lösung 11,4703 g, mithin Prozentgehalt 4,26; spez. Gewicht 1,10; Drehung im 2-Dezimeterrohr bei 20⁰ für Natriumlicht 2,10⁰ nach links. Daraus würde sich berechnen $[\alpha]_D^{20}$ —22,4⁰. Wie schon erwähnt, haben Schulze und Likiernik durch Vergärung der α-Amino-n-capronsäure mit Penicillium glaucum eine aktive Säure gewonnen, die unter den gleichen Bedingungen $[\alpha]_D$ — 26,5⁰ zeigte. Nimmt man an, daß ihr Präparat reine aktive Säure war, so würde sich aus diesen Zahlen für unsere Substanz ein Gehalt von 16 % Racemkörper ergeben.

d-Benzoyl-α-Amino-n-capronsäure.

Sie findet sich in den Mutterlaugen, aus welchen das Cinchoninsalz des optischen Antipoden auskristallisiert ist.

Dieselben werden zunächst mit überschüssigem Alkali versetzt, das ausgeschiedene Cinchonin abfiltriert und die Mutterlauge mit soviel Salzsäure versetzt, daß alles Alkali dadurch gebunden wird. Läßt man jetzt die Flüssigkeit 1—2 Tage bei 0⁰ stehen, so kristallisiert racemische Benzoyl-α-amino-n-capronsäure und zwar ist die Abscheidung so vollständig, daß fast gar keine l-Benzoylverbindung mehr in Lösung bleibt.

Verdampft man nun das Filtrat unter stark vermindertem Druck auf ¹/₄ seines Volumens, so kristallisiert nach dem Erkalten allmählich die rechtsdrehende Benzoylverbindung in denselben Formen wie das optische Isomere. Die Mutterlaugen geben bei weiterer Konzentration noch neue Mengen. Die Ausbeute entspricht ungefähr der für die l-Verbindung angegebenen Menge, und nach einmaligem Umkristallisieren aus warmem Wasser ist das Präparat ganz frei von Racemkörper. Dieses Resultat, welches bei bloßer Kristallisation von Gemischen aktiver und

racemischer Substanzen sehr selten erreicht wird, ist um so erfreulicher, als es uns bisher nicht gelungen ist, ein kristallisiertes Salz der *d*-Benzoylaminocapronsäure mit einem aktiven Alkaloïd zu gewinnen.

Die Kristalle der *d*-Verbindung schmelzen gerade so wie das optische Isomere bei 53° (korr.) und enthalten Kristallwasser, welches bei 100° völlig entweicht, wobei eine ganz amorphe Masse zurückbleibt. Die Analyse der letzteren gab folgende Zahlen:

0,1951 g Sbst.: 0,4735 g CO_2, 0,1293 g H_2O.

$C_{13}H_{17}NO_3$. Ber. C 66,39, H 7,23.
Gef. „ 66,18, „ 7,36.

Für die optische Bestimmung diente das kristallwasserhaltige Präparat. 0,9696 g wurden in 5 ccm Normal-Kalilauge und 6,1 ccm Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 11,806 g, mithin Prozentgehalt 8,21. Spez. Gewicht 1,026; Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° im Natriumlicht 1,8° nach rechts. Mithin in alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20°}$ + 21,4°, während für die *l*-Verbindung —21,9° gefunden wurde.

d-α-Amino-*n*-capronsäure.

Sie wurde ebenso dargestellt wie die *l*-Verbindung und zeigte mit derselben äußerlich die größte Ähnlichkeit. Die Analyse ergab:

0,1701 g Sbst.: 0,3415 g CO_2, 0,1529 g H_2O.

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92.
Gef. „ 54,75, „ 9,98.

Für die optische Bestimmung diente wieder die Lösung in 20-prozentiger Salzsäure.

Gewicht der Substanz 0,4411 g, Gewicht der Lösung 11,4090 g, mithin Prozentgehalt 3,86; spez. Gewicht 1,10; Drehung bei 20° im 2-Dezimeterrohr für Natriumlicht 1,81° nach rechts, woraus sich $[\alpha]_D^{20} = +21,3°$ berechnet. Das Präparat würde demnach ungefähr 20% Racemkörper enthalten haben.

Um diesen Schluß zu kontrollieren, haben wir die Säure durch Behandlung mit Natriumbicarbonat und Benzoylchlorid in die Benzoylverbindung zurückverwandelt und durch deren optische Untersuchung einen Gehalt von 17,6% Racemkörper gefunden.

Schließlich erwähnen wir noch einen Versuch, den Äthylester der α-Amino-*n*-capronsäure durch *d*-Weinsäure in die optischen Komponenten zu zerlegen, der zwar nur partiellen Erfolg gehabt hat, aber vielleicht in anderen Fällen mit Nutzen verwertet werden kann.

Fügt man zu einer Lösung von 3 Teilen Weinsäure in 5 Teilen Wasser, die auf 0° abgekühlt ist, allmählich 3 g des inaktiven α-Amino-*n*-Capronsäureäthylesters[1]), so erstarrt das kalt gehaltene Gemisch nach kurzer Zeit zu einem Kristallbrei des sauren Tartrats. Nach Vermischen mit 4 ccm eiskaltem Wasser wurden die Kristalle abgesaugt, abgepreßt, in 15 ccm lauwarmem Wasser gelöst, nach dem Abkühlen mit Kaliumcarbonat zersetzt und der ausgeschiedene Ester mit Äther extrahiert. Die aus dem Ester regenerierte Aminosäure wurde aus Wasser fraktioniert kristallisiert. Die erste Fraktion 0,5 g war optisch-inaktiv; die beiden folgenden von je 0,4 g zeigten in 20-prozentiger Salzsäure die spezifische Drehung +12,8° und +14,9°, während die reine *d*-Aminosäure +26,5° haben soll. Man sieht daraus, daß die Methode prinzipiell brauchbar ist; aber ihre Anwendung wird erschwert durch die leichte Verseifbarkeit des Esters, welche öfteres Umkristallisieren des Tartrats unmöglich macht.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 450 [1901].

6. Emil Fischer und Otto Warburg: Spaltung des Leucins in die optisch-aktiven Komponenten mittels der Formylverbindung.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 38, 3997 (1905).
(Eingegangen am 29. November.)

Die früher beschriebene Zerlegung des racemischen Leucins mittels der Benzoylverbindung[1]) ist recht unbequem, da die Rückverwandlung des aktiven Benzoylkörpers in die Aminosäure durch längeres Kochen mit 100-fachen Menge Salzsäure bewerkstelligt wird, und die Darstellung der Benzoylverbindung selbst schon einige Mühe bereitet. Auch die Zerlegung des Leucinäthylesters mittels Pankreasferment ist für die Bereitung reiner Präparate nicht besonders geeignet[2]). Da wir aber für den Aufbau aktiver Leucinpeptide größere Mengen der aktiven Aminosäure nötig hatten, so haben wir ein bequemeres Darstellungsverfahren für dieselbe gesucht und durch Benutzung des Formylderivates an Stelle der Benzoylverbindung gefunden.

Das inaktive Formylleucin läßt sich sehr leicht durch Kochen der Aminosäure mit Ameisensäure bereiten. Seine Trennung in die optischen Komponenten gelingt ebenfalls leicht mit Brucin, und die Rückverwandlung der aktiven Formylkörper in die Aminosäuren läßt sich überraschend schnell durch Kochen mit Säuren oder Erwärmen mit verdünnten Alkalien bewerkstelligen.

Formyl-*dl*-leucin.

Bekanntlich ist die Ameisensäure viel mehr zur Amidbildung geneigt, als ihre Homologen. Das zeigt sich auch an dem Verhalten gegen die Aminosäuren, denn es genügt, diese mit wasserfreier Ameisensäure auf 100^0 zu erhitzen, um die Formylverbindung zu erzeugen[3]). Leider ist, wie zu erwarten war, die Reaktion nicht vollständig, weil der Prozeß

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2370 [1900]. (*S. 118.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 187 [1905].

[3]) Bei den aromatischen Aminosäuren ist diese leichte Bildung des Formylderivates längst bekannt. Vgl. Zehra, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **23**, 3633 [1890].

offenbar umkehrbar ist. Verwendet man z. B. die 3-fache Menge Ameisensäure und erhitzt 10 Stunden, so beträgt die Ausbeute an Formylkörper nur 55—60% der Theorie, und es lassen sich aus dem Rohprodukt große Mengen unverändertes Leucin zurückgewinnen. Es ist deshalb vorteilhaft, das durch die Reaktion entstehende Wasser zum größeren Teil zu entfernen. Dem entspricht folgende Vorschrift:

Leucin wird mit der $1^1/_2$-fachen Menge wasserfreier, käuflicher Ameisensäure (von 98,5%) 3 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, wobei es genügt, den Kolben mit einem kurzen, zu einer Kapillare ausgezogenen Steigrohr zu versehen. Dann verdampft man unter einem Druck von etwa 20 mm das Lösungsmittel möglichst vollständig. Der zurückbleibende Sirup wird abermals mit der gleichen Menge Ameisensäure 3 Stunden auf 100° erhitzt, dann wieder abdestilliert und diese Operation nochmals wiederholt. Beim Verdampfen erstarrt jetzt der Rückstand kristallinisch.

Dieses Produkt wird ungefähr mit der $1^1/_2$-fachen Menge eiskalter Normal-Salzsäure verrieben, um das noch unveränderte Leucin zu lösen, dann scharf abgesaugt und mit wenig eiskaltem Wasser sehr sorgfältig gewaschen, um alle Salzsäure zu entfernen. Im Vakuum getrocknet beträgt das fast farblose Rohprodukt gegen 80% der Theorie. Es wird in der 3-fachen Menge heißem Wasser gelöst, mit wenig Tierkohle aufgekocht und das Filtrat stark abgekühlt, wobei es zu einem dicken Kristallbrei erstarrt. Der Verlust beim Umkristallisieren beträgt etwa 10% des Rohproduktes. Die salzsaure Lösung enthält noch Leucin und außerdem Formylleucin, welches beim Abdampfen mit überschüssiger Salzsäure auf dem Wasserbade hydrolysiert wird. Das als Rückstand bleibende salzsaure Leucin wird in bekannter Weise durch Ammoniak in die Aminosäure zurückverwandelt, und der endgültige Verlust an Leucin ist dann sehr gering. Für die Analyse war das Präparat im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1826 g Sbst.: 0,3536 g CO_2, 0,1372 g H_2O. — 0,1878 g Sbst.: 14 ccm N (16°, 755 mm) über 33-proz. KOH.

$C_7H_{13}O_3N$. Ber. C 52,78, H 8,23, N 8,82.
Gef. „ 52,81, „ 8,41, „ 8,66.

Das Formylleucin zeigt keinen ganz konstanten Schmelzpunkt; es wird bei 112° weich und schmilzt bei 114—115°. (115—116° korr.). Es löst sich sehr leicht in absolutem Alkohol und heißem Wasser, und ziemlich leicht in heißem Essigester; ziemlich schwer in Äther, Benzol und Chloroform; in Petroläther ist es fast unlöslich. Beim langsamen Abkühlen in wässeriger Lösung kristallisiert es in schön ausgebildeten Formen, die unter dem Mikroskop an Oktaëder mit häufig abgeschrägten

Ecken erinnern. Es reagiert sauer und löst sich leicht in Alkalien und Ammoniak.

Das Formylleucin läßt sich durch Chlorphosphor leicht in ein Produkt verwandeln, das wir für Formylleucylchlorid, $C_4H_9.CH(NH.COH).CO.Cl$, halten. Für seine Bereitung übergießt man 10 g gepulvertes Formylleucin in einer Schüttelflasche mit 50 ccm frisch destilliertem, eiskaltem Acetylchlorid und trägt im Laufe von 15—20 Minuten unter Schütteln und Eiskühlung 14,5 g frisches Phosphorpentachlorid in 5—6 Portionen ein. Hierbei findet klare Lösung statt. Sie wird sofort bei möglichst niederem Druck (0,5 mm) verdampft, der Rückstand mit trocknem Petroläther verrieben und bei Ausschluß von Feuchtigkeit abgesaugt. Im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet, ist das Chlorid ein farbloses, glänzendes, anscheinend kristallinisches Pulver. Die Analyse gab nur annähernde Werte. 0,222 g verbrauchten 11,1 ccm $^1/_{10}$-n-Silbernitrat-Lösung. Gef. Cl 17,7. Ber. Cl 19,97. Die Versuche über die Verwendung des Chlorids zum Aufbau von Polypeptiden sind noch nicht abgeschlossen.

Formylglycin, $CHO.NH.CH_2.COOH$.

Gerade so wie beim Leucin werden 5 g reines Glykocoll mit 7,5 g Ameisensäure 3 Stunden auf 100° erhitzt, dann unter geringem Druck verdampft und der Rückstand noch zweimal in der gleichen Weise mit Ameisensäure behandelt. Zum Schluß bleibt eine schwach gelbe, kristallinische Masse zurück. Zur Entfernung von etwas unverändertem Glykocoll wird sie mit wenig eiskaltem Wasser ausgelaugt und dann aus der 3-fachen Menge warmem Wasser umkristallisiert. Zur Analyse war das Präparat nochmals aus etwa 80 Teilen Essigester umkristallisiert und im Vakuumexsikkator getrocknet.

0,2031 g Sbst.: 0,2595 g CO_2, 0,0898 g H_2O. — 0,1917 g Sbst.: 22,8 ccm N (20°, 757 mm).

$C_3H_5O_3N$. Ber. C 34,93, H 4,88, N 13,6.
Gef. „ 34,85, „ 4,95, „ 13,6.

Das Formylglycin erweicht gegen 149° und schmilzt bei 151 bis 152° (korr. 153—154°) unter Gasentwickelung. Es ist in Wasser und Alkohol in der Hitze recht leicht löslich und kristallisiert daraus rasch. Die Form ist verschieden; manchmal derb, manchmal 4- oder 6-seitige Blättchen, die öfters sternförmig vereinigt sind. In Aceton und Essigester ist es ziemlich schwer und in Äther und Benzol sehr schwer löslich. Es schmeckt stark sauer.

Ähnlich den Aminosäuren lassen sich auch die Polypeptide formylieren. Aus dem Leucylglycin z. B. entsteht ein anfangs

sirupöses, später kristallisierendes Produkt, das sich von dem Dipeptid durch die große Löslichkeit in Wasser unterscheidet. Bemerkenswert ist die leichte Abspaltung der Formylgruppe; denn als eine Lösung des Formylkörpers in überschüssiger Normal-Natronlauge (3 Mol.) 3 Tage im Brutraum gestanden hatte, war eine große Menge von Leucylglycin zurückgebildet. Auf diese Beobachtung läßt sich vielleicht eine neue Synthese von Polypeptiden mittels der Formylderivate gründen.

Spaltung des Formyl-*dl*-leucins mit Brucin.

Zu einer Lösung von 50 g Formyl-*dl*-leucin in 4 L absolutem Alkohol setzt man 124 g wasserfreies Brucin (1 Mol.) und erwärmt unter Umschütteln, bis völlige Lösung eingetreten ist. Beim Abkühlen erfolgt sofort die Kristallisation vom Brucinsalz des Formyl-*d*-leucins. Man läßt unter zeitweisem Schütteln 12 Stunden im Eisschrank stehen, saugt die Kristallmasse scharf ab und wäscht sie sorgfältig mit etwa 500 ccm kaltem Alkohol. Die Menge der Kristallmasse beträgt ungefähr 93 g. Umlösen des Salzes hat keinen Zweck, da dadurch kein reineres aktives Formylleucin erhalten wird. Die alkoholische Mutterlauge, die das Brucinsalz des Formyl-*l*-leucins enthält, wird unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand in 450 ccm Wasser gelöst, dann die Flüssigkeit auf 0° abgekühlt und mit 175 ccm Normal-Natronlauge versetzt; dadurch wird das Brucin gefällt. Man läßt noch etwa 10 Minuten in Eis stehen, saugt dann ab und wäscht mit wenig kaltem Wasser. Um den sehr kleinen Rest des Brucins zu entfernen, kann man das Filtrat erst mit Chloroform und dann nochmals mit Äther ausschütteln, bis die wässerige Lösung mit Salpetersäure keine Brucinreaktion mehr gibt.

Um den größeren Teil des Alkalis, das bei längerer Einwirkung eine partielle Hydrolyse des Formylkörpers bewirken kann, zu neutralisieren, fügt man möglichst bald 23 ccm 5-fach Normal-Salzsäure zu, verdampft unter geringem Druck auf etwa 100 ccm und übersättigt jetzt durch weitere Zugabe von 15 ccm derselben Salzsäure. Dadurch wird die Abscheidung des Formyl-*d*-leucins, die schon während des Einengens begonnen hat, vervollständigt. Man läßt noch eine Viertelstunde in Eiswasser stehen, saugt dann ab und wäscht mit kaltem Wasser.

Die Ausbeute an rohem Formyl-*l*-leucin betrug 22 g und nach dem Umkristallisieren aus der 5-fachen Menge Wasser 19 g.

Das Formyl-*d*-leucin wird aus dem kristallisierten Brucinsalz ganz in der gleichen Weise gewonnen. Seine Menge betrug nach dem Umkristallisieren 18 g.

Die aktiven Formylleucine zeigen ähnliche Löslichkeitsverhältnisse wie das inaktive Produkt, aber einen erheblich höheren Schmelz-

punkt. Dieser ist leider auch nicht ganz konstant; er lag bei den analysierten Präparaten zwischen 139—142° (141—144° korr.), nachdem bei 137° schon Erweichen eingetreten war. Sie kristallisieren aus warmem Wasser in häufig zentimeterlangen Formen, die unter dem Mikroskop als lang gestreckte, schmale Prismen erscheinen und makrospopisch wie dicke Nadeln aussehen. Für die Analyse wurden sie im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Für die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens diente die Lösung in absolutem Alkohol, in der keine merkbare Veresterung im Laufe von einigen Stunden erfolgt.

Formyl-*d*-leucin.

Für die Analyse diente das einmal aus Wasser umkristallisierte und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Präparat.

0,1880 g Sbst.: 0,3638 g CO_2, 0,1405 g H_2O. — 0,1933 g Sbst.: 14,4 ccm N (15°, 763 mm) über 33-proz. KOH.

$C_7H_{13}O_3N$. Ber. C 52,77, H 8,23, N 8,82.
Gef. „ 52,78, „ 8,36, „ 8,77.

Drehungsvermögen des analysierten Präparates.

1,3347 g Sbst.; dazu 13,3 ccm absoluter Alkohol; Gesamtgewicht der Lösung 11,8965 g; d_4^{20} = 0,8169. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: +1,76°; mithin $[\alpha]_D^{20^\circ}$ = +19,2°, wobei zu bemerken ist, daß der Beobachtungsfehler für $[\alpha]_D$ 0,2° betragen kann.

Das Präparat, welches die spez. Drehung +19,2° zeigte, wurde nochmals aus der 5-fachen Menge Wasser umkristallisiert und ergab dann eine etwas geringere Drehung.

1,3446 g Sbst.; dazu 13,4 ccm absoluter Alkohol; Gesamtgewicht der Lösung 12,0247 g; d_4^{20} = 0,8169. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: +1,72°. $[\alpha]_D^{20}$ = +18,8° (±0,2°).

Formyl-*l*-leucin.

Für die Analyse und erste optische Bestimmung diente wieder das einmal aus Wasser umkristallisierte Präparat.

0,1702 g Sbst.: 0,3293 g CO_2, 0,1283 g H_2O. — 0,1952 g Sbst.: 14,3 ccm N (12°, 753 mm) über 33-proz. KOH.

$C_7H_{13}O_3N$. Ber. C 52,78, H 8,23, N 8,82.
Gef. „ 52,76, „ 8,43, „ 8,63.

1,3313 g Sbst.; dazu 13,3 ccm absoluter Alkohol; Gesamtgewicht der Lösung 11,8375 g; d_4^{20} = 0,8203. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: −1,7°. $[\alpha]_D^{20}$ = −18,4° (±0,2°).

Dieses Präparat wurde nochmals aus der 5-fachen Menge Wasser umkristallisiert.

1,3412 g Sbst; dazu 13,4 ccm absoluter Alkohol; Gesamtgewicht der Lösung 11,9639 g; $d_4^{20} = 0{,}8168$. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: $-1{,}69°$. $[\alpha]_D^{20°} = -18{,}5°$ ($\pm 0{,}2°$).

In alkalischer Lösung gaben die Formylleucine eine viel stärkere Drehung.

Eine 5-prozentige Lösung der *d*-Verbindung in Normal-Natronlauge zeigte bei 20° ungefähr die spezifische Drehung $+40°$, aber die genaue Bestimmung des Wertes ist nicht möglich, weil schon bei der niederen Temperatur eine langsame Abspaltung der Formylgruppe erfolgt.

Hydrolyse der Formylverbindung.

Die Abspaltung der Formylgruppe läßt sich sowohl mit Säuren, wie mit Alkalien leicht bewerkstelligen. Für die Gewinnung der aktiven Form ist aber die saure Hydrolyse vorzuziehen, weil die Gefahr der Racemisierung geringer ist. Dementsprechend wurde für die Darstellung des *l*-Leucins die Formylverbindung mit der 10-fachen Menge 10-prozentiger Salzsäure 1—1$^1/_2$ Stunden am Rückflußkühler gekocht und dann die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck möglichst stark eingedampft. Den Rückstand löst man in Wasser und verdampft jetzt auf dem Wasserbade, um den Rest der überschüssigen Salzsäure und geringe Mengen von Ameisensäure zum allergrößten Teil zu entfernen. Zum Schluß löst man wieder in Wasser, verdünnt auf ein bestimmtes Volumen und bestimmt in einem aliquoten Teil dieser Lösung titrimetrisch das Chlor. Dann fügt man zu dem Hauptteil der Flüssigkeit die nach dem Chlorgehalt berechnete Menge einer Normal-Lösung von Lithiumhydroxyd, verdampft auf dem Wasserbade auf ein geringes Volumen, bis der größte Teil des Leucins auskristallisiert ist, und fällt den Rest durch absoluten Alkohol, wobei das Lithiumchlorid in Lösung bleibt.

Die Ausbeute beträgt etwa 90% der Theorie, berechnet auf das aktive Formylleucin; sie ist nicht unerheblich größer, als bei der Abscheidung der Aminosäure mittels Ammoniak, die beim Racemkörper so gute Dienste leistet. Das hängt zusammen mit der größeren Löslichkeit des aktiven Leucins in Wasser und auch in einer wässerigen Lösung von Ammoniumchlorid.

Zur völligen Reinigung wird schließlich das Präparat in heißem Wasser gelöst und durch starkes Eindampfen größtenteils wieder zur Abscheidung gebracht.

Da das aktive Leucin in wässeriger Lösung zu schwach dreht, so benutzt man nach dem Vorgange von E. Schulze gewöhnlich eine Lösung in 20-prozentiger Salzsäure mit einer Konzentration von 4—5%.

Aber die einzelnen Beobachtungen zeigen ziemlich starke Abweichungen. Während Schulze für natürliches Leucin Werte zwischen +17,3° bis 17,8° fand, erhielt der eine von uns für die beiden aktiven Leucine, die aus der synthetischen Benzoylverbindung dargestellt waren, Werte von 15,6° bis 16° für $[\alpha]_D^{20°}$ [1]). Da die letzteren Bestimmungen meist im 1-Dezimeterrohr ausgeführt waren, so betrug der Beobachtungsfehler etwa 0,4° für $[\alpha]_D$.

Herr Prof. E. Schulze hat uns jetzt auf unsere Bitte ein Präparat von *l*-Leucin übersandt, das aus Eiweißkörpern gewonnen und mit besonderer Sorgfalt gereinigt war. Nach der Beobachtung des Herrn Schulze, die wir bestätigt fanden, und mit Genehmigung des Autors mitteilen, zeigte es bei den gleichen Konzentrationsverhältnissen den Wert $[\alpha]_D^{20°}$ +16,9°. Wir stellen dem nun die Zahlen gegenüber, die wir für verschiedene Proben von Leucin erhielten, das aus der Formylverbindung durch Hydrolyse mit Salzsäure oder auch mit Bromwasserstoff nach obigem Verfahren gewonnen war.

d-Leucin. Erhalten aus der Formylverbindung durch $1^1/_2$-stündiges Kochen mit der 10-fachen Menge Salzsäure am Rückflußkühler und isoliert aus dem Chlorhydrat mit Lithiumhydroxyd. Einmal aus heißem Wasser umkristallisiert.

1,1781 g Leucin in 20-prozentischer Salzsäure gelöst; Gesamtgewicht der Lösung 32,5207 g; $d = 1{,}1$. Drehung im 2-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: −1,22° (±0,02°). Mithin $[\alpha]_D^{20°} = -15{,}3°$ (±0,2°).

Der mögliche Beobachtungsfehler bei der optischen Bestimmung ist stets den gefundenen Werten beigefügt.

Das vorige Präparat wurde nochmals in wenig überschüssiger Salzsäure gelöst und durch Ammoniak gefällt, wobei fast die Hälfte in der Mutterlauge blieb. (Gef. N 10,5. Ber. N 10,7.)

0,6588 g Leucin gelöst in 20-prozentiger Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 14,8296 g; $d = 1{,}1$. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: −0,76° (±0,02°). Mithin $[\alpha]_D^{20} = -15{,}6°$ (±0,4°).

d-Leucin. Aus der Formylverbindung durch 10-stündiges Schütteln mit der 15-fachen Menge Bromwasserstoff (ca. 30-proz.) bei 37° hergestellt und aus dem Bromhydrat mit Ammoniak isoliert, dann aus heißem Wasser umkristallisiert.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2377 [1900]. (*S. 118.*)

0,6324 g Leucin gelöst in 20-prozentiger Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 17,2606 g; $d = 1,1$. Drehung im 2-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: $-1,26^0$ ($\pm 0,02^0$). Mithin $[\alpha]_D^{20} = -15,6^0$ ($\pm 0,2^0$).

l-Leucin. Aus der Formylverbindung durch $1^1/_4$-stündiges Kochen mit der 10-fachen Menge 10-prozentiger Salzsäure dargestellt und aus dem Chlorhydrat mit Ammoniak isoliert, dann aus Wasser umkristallisiert.

0,6985 g Leucin gelöst in 20-prozentiger Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 15,1313 g; $d = 1,1$. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: $+0,81^0$ ($\pm 0,02^0$). Mithin $[\alpha]_D^{20} = +15,9^0$ ($\pm 0,4^0$).

l-Leucin. Aus der Formylverbindung durch einstündiges Kochen mit der 10-fachen Menge 10-prozentigem Bromwasserstoff dargestellt und aus dem Bromhydrat mit Ammoniak isoliert; zum Schluß aus Wasser umkristallisiert. (Gef. C 54,96, H 10,03. Ber. C 54,9, H 10,0.)

0,6749 g Leucin gelöst in 20-prozentiger Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 16,3497 g; $d = 1,1$. Drehung im 2-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: $+1,43^0$ ($\pm 0,02^0$). Mithin $[\alpha]_D^{20} = +15,8^0$ ($\pm 0,2^0$).

Man sieht daraus, daß unsere Werte zwischen 15,3° und 15,9° schwanken, wobei aber bei den Bestimmungen im 1-Dezimeterrohr der Beobachtungsfehler für die spezifische Drehung 0,4° betragen kann. Das Mittel von diesen Versuchen würde ungefähr 15,6° sein, was mit den früheren Resultaten, die sich auf Leucin aus der Benzoylverbindung beziehen, ziemlich gut übereinstimmt.

Wir haben dann endlich noch aus reinem racemischen Leucin die aktive Verbindung durch Verfütterung bei einem Kaninchen nach den Angaben von Wohlgemuth[1]) dargestellt und aus dem Harn ein Produkt isoliert, das folgende Drehung gab:

0,2689 g Leucin gelöst in 20-prozentiger Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 6,7310 g; $d = 1,1$. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht: $-0,68^0$ ($\pm 0,02^0$). Mithin $[\alpha]_D^{20} = -15,5$ ($\pm 0,4^0$).

Wenn der neuere Wert von Schulze 16,9° als richtig angenommen wird, so würden alle diese Präparate etwas Racemkörper, im Maximum etwa 10%, enthalten müssen. Wir können uns aber nicht verhehlen, daß auch für das Präparat aus Eiweißkörpern die Garantie der absoluten Reinheit noch fehlt, da es bekanntlich recht schwierig ist, alle isomeren oder homologen Aminosäuren völlig zu entfernen.

Die Frage nach der wirklichen Drehung des reinen aktiven Leucins erscheint mithin noch nicht definitiv gelöst.

Wir haben endlich durch 48-stündiges Erwärmen der Formylverbindung mit 3 Mol.-Gew. *n*-Natronlauge auf 37° aktives Leucin bereitet,

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2064 [1905].

aber bei solchen Präparaten stets eine etwas geringere Drehung (14,8° in obiger salzsaurer Lösung) beobachtet, als bei denjenigen, die durch saure Hydrolyse dargestellt waren. Die Schnelligkeit der alkalischen Spaltung ergibt sich aus folgenden Beobachtungen:

3 g Formyl-*d*-leucin in 57 ccm *n*-NaOH (ca. 3 Mol.-Gew.) gelöst. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei Natriumlicht und 20° nach:

0	Stunden	+2,25°
8	„ im Brutraum	+0,5°
26	„ „ „	−0,2°
48	„ „ „	−0,33°.

Da die Drehung des Leucins in alkalischer Lösung bekannt ist, kann man aus diesen Zahlen die Schnelligkeit der Hydrolyse ungefähr berechnen.

Zum Schluß führen wir noch eine merkwürdige Beobachtung bezüglich des Geschmacks der beiden Leucine an. Während die natürliche *l*-Verbindung fade und ganz schwach bitter schmeckt, hat der optische Antipode, der bisher in der Natur nicht gefunden wurde, einen ausgesprochen süßen Geschmack. Dadurch erklärt es sich, daß das racemische Leucin auch schwach süß schmeckt.

Man ersieht aus dieser Beobachtung, daß der süße Geschmack keineswegs eine allgemeine Eigenschaft der natürlichen α-Aminosäuren ist.

Obige Spaltungsmethode dürfte für manche racemischen Aminosäuren anwendbar sein. So können wir schon jetzt mitteilen, daß nach Versuchen des Herrn W. Schoeller die Zerlegung des Formylphenylalanins durch Brucin leicht gelingt.

---

7. Max D. Slimmer: Über Aminovaleriansäuren.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **35**, 400 (1902).
(Eingegangen am 13. Januar.)

Unter den Spaltungsprodukten der Proteïnstoffe sind wiederholt Aminovaleriansäuren beobachtet worden. Eine derselben, welche von E. und H. Salkowski[1]) bei der Fäulnis von Fibrin, Fleisch und Leim gefunden wurde, ist als δ-Amino-*n*-valeriansäure charakterisiert worden. Über die Struktur der anderen weiß man aber so gut wie gar nichts, und da auch die analytische Untersuchung wegen der schwierigen Beschaffung dieser Produkte sehr mühsam ist, so schien es zweckmäßiger, die verschiedenen Aminovaleriansäuren synthetisch zu bereiten und durch das Studium ihrer Derivate so zu kennzeichnen, daß sie mit den natürlichen Produkten verglichen werden können. Das ist der Zweck der nachfolgenden Versuche, welche ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Emil Fischer ausgeführt habe.

Von den zwölf theoretisch möglichen Aminovaleriansäuren sind folgende fünf bekannt:

1. α-Amino-*n*-valeriansäure.
2. α-Aminoisovaleriansäure.
3. β-Aminoisovaleriansäure.
4. γ-Amino-*n*-valeriansäure.
5. δ-Amino-*n*-valeriansäure.

Die beiden letzten sind durch den leichten Übergang in ihre Anhydride von den übrigen so scharf unterschieden, daß ihre Erkennung keine Schwierigkeiten bietet. Dagegen ist die Kenntnis der drei übrigen so lückenhaft, daß es kaum möglich sein würde, ein natürliches Produkt mit ihnen zu identifizieren. Ich habe sie deshalb ausführlicher untersucht und eine größere Zahl von Derivaten dargestellt. Ferner habe ich die bisher unbekannte α-Aminomethyläthylessigsäure nach dem Verfahren von Tiemann[2]) aus dem Methyläthylketon durch Anlagerung von Blausäure und Ammoniak bereitet.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **31**, 777 [1898]; **16**, 1192 [1883].
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **14**, 1971 [1881].

Da die Aminosäuren, welche aus den Proteïnstoffen entstehen, meist optisch aktiv sind, so habe ich auch noch versucht, die beiden bis jetzt bekannten α-Verbindungen mit Hilfe der Methode von E. Fischer[1]) in die optischen Komponenten zu spalten, ohne aber bis jetzt zu endgültigen Resultaten zu gelangen.

I. α-Aminoisovaleriansäure, $(CH_3)_2CH.CH(NH_2).COOH$.

Sie wurde von Clark und Fittig[2]) aus der Bromverbindung und von Lipp[3]) aus Isobutyraldehyd gewonnen.

Das erste Verfahren ist für die Darstellung geeigneter. Beim Arbeiten in größerem Maßstabe habe ich aber einige kleine Abänderungen zweckmäßig gefunden und bin bei folgendem Verfahren stehen geblieben.

500 g α-Bromisovaleriansäure werden mit 1500 g wässerigem Ammoniak, welches bei 15° gesättigt ist, unter Zusatz von 500 g gepulvertem, käuflichem, kohlensaurem Ammonium in einem eisernen Autoklaven 8 Stunden auf 100° erhitzt, wobei der Druck auf 5—6 Atmosphären steigt. Die schwach braun gefärbte Flüssigkeit wird nach dem Öffnen des Autoklaven wieder zum Kochen erhitzt, wobei sich manchmal Eisenhydroxyd abscheidet, dann filtriert und auf $^1/_3$ ihres Volumens eingedampft. Hierbei und noch mehr beim Abkühlen scheidet sich der größte Teil der Aminosäure als fast farblose Kristallmasse ab. Für die Gewinnung des Restes wird die Mutterlauge mit Salzsäure schwach angesäuert, zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit ungefähr einem Liter 80-prozentigem Alkohol ausgelaugt, wobei die Aminosäure als Hydrochlorat in Lösung geht. Leitet man in das Filtrat gasförmiges Ammoniak ein, so fällt nach einiger Zeit die Aminosäure aus, während die Ammoniumsalze in Lösung bleiben.

Man vermeidet so die für größere Mengen unbequeme Entfernung des Halogens durch Bleioxyd. Die Ausbeute beträgt etwa 70% der Theorie, und das Produkt ist so rein, daß es für die Darstellung aller Derivate direkt benutzt werden kann.

Der Beschreibung der freien Säure von Clark und Lipp kann ich folgendes hinzufügen. Im geschlossenen Kapillarrohr schmilzt sie beim raschen Erhitzen gegen 298° (korr.) unter Zersetzung. Der Geschmack ist süß. Sie löst sich bei 15° in 11,7 Teilen Wasser.

Für diese Bestimmungen diente ein durch Kristallisieren aus heißem Wasser gereinigtes Präparat, welches nach dem Trocknen bei 100° die folgenden Zahlen gab:

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2451 [1899]. (*S. 87.*)

[2]) Ann. d. Chem. **139**, 200 [1866].

[3]) Ann. d. Chem. **205**, 18 [1880].

0,3112 g Sbst.: 0,5854 g CO_2, 0,2681 g H_2O. — 0,2487 g Sbst.: 25,7 ccm N (18°, 752 mm).

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28, H 9,40, N 11,95.
Gef. „ 51,15, „ 9,61, „ 11,99.

Das von Clark und Fittig schon beschriebene Hydrochlorat schmilzt bei 189° (korr.).

Der

α-Aminoisovaleriansäureäthylester

wird auf die gewöhnliche Weise[1]) mit Alkohol und Salzsäure dargestellt, mit Alkali und Kaliumcarbonat isoliert und über Natriumsulfat getrocknet. Unter 8 mm Druck siedet er bei 63,5° (F. g. i. D.). Bei gewöhnlichem Druck siedet er bei 174°, wobei aber schon ziemlich starke Zersetzung bemerkbar ist. Spez.-Gew. 0,9617, $\frac{15^0}{4^0}$.

Der Ester ist durch Unbeständigkeit ausgezeichnet; denn bei gewöhnlicher Temperatur beobachtet man schon nach mehreren Stunden die Abscheidung von Kristallen, und nach 24 Stunden ist schon die Hauptmenge in das feste Produkt (wahrscheinlich ein Piperazinderivat) umgewandelt.

Für die Analyse diente ein frisch destilliertes Präparat.

0,2135 g Sbst.: 0,4516 g CO_2, 0,2006 g H_2O. — 0,1901 g Sbst.: 16,4 ccm N (22°, 739 mm).

$C_7H_{15}O_2N$. Ber. C 57,93, H 10,34, N 9,65.
Gef. „ 57,69, „ 10,44, „ 9,71.

In Wasser ist der Ester leicht löslich, wird aber durch Kaliumcarbonat ausgesalzen. Das in kaltem Wasser recht schwer lösliche Pikrat bildet kleine gelbe Kristalle, welche bei 139,5° (korr.) schmelzen. Beim Kochen mit Wasser wird es langsam zersetzt, auch beim Aufbewahren in trockenem Zustande sinkt der Schmelzpunkt.

Das Bitartrat kristallisiert aus Wasser, in welchem es leicht löslich ist, in dünnen Prismen. Dabei findet eine teilweise Spaltung in die optischen Komponenten statt, denn die aus dem Tartrat freigemachte Aminosäure ist optisch aktiv. Als Maximum der Drehung wurde in 20-prozentiger Salzsäure die spezifische Drehung = +11,46° gefunden, aber ebensowenig wie bei den analogen Versuchen von E. Fischer und Hagenbach[2]) ist es gelungen, auf diesem Wege ein Präparat von konstanter Drehung zu erhalten.

---

[1]) Vgl. E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 433 [1901]. (*S. 173.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 3764 [1901]. (*S. 148.*)

Die

Benzoyl-α-aminoisovaleriansäure,

$(CH_3)_2CH.CH.(NH.COC_6H_5).COOH$,

wurde mit Benzoylchlorid und Bicarbonat nach dem Verfahren von E. Fischer[1]) dargestellt. Zur Trennung von der Benzoësäure fällt man die ätherische Lösung mit Petroläther. Die Ausbeute betrug 63% der Theorie. Für die Analyse war die Verbindung bei 100° getrocknet.

0,0894 g Sbst.: 0,2130 g CO_2, 0,0546 g H_2O. — 0,3229 g Sbst.: 18,3 ccm N (17°, 753 mm).

$C_{12}H_{15}O_3N$. Ber. C 65,15, H 6,78, N 6,33.
Gef. „ 64,98, „ 6,82, „ 6,50.

Die Substanz schmilzt bei 132,5° (korr.). Sie ist in Äther und Alkohol ziemlich leicht, dagegen in Wasser auch in der Hitze sehr schwer löslich und in Ligroïn so gut wie unlöslich. Sie kristallisiert aus Äther auf Zusatz von Ligroïn in schönen Blättchen.

Ihre Salze mit Morphin, Brucin, Cinchonin und Strychnin waren sirupös; das Chininsalz zeigte Neigung zum Kristallisieren, war aber auch für die Spaltung in die optischen Komponenten nicht geeignet.

Verbindung mit Phenylisocyanat.

$(CH_3)_2CH.CH(NH.CO.NH.C_6H_5).COOH$.

Die Aminosäure wird mit ein Mol.-Gew. Kalilauge in 40 Teilen Wasser gelöst und bei 0° unter heftigem Rühren $^5/_4$ Mol.-Gew. Phenylisocyanat langsam zugetropft. Beim Ansäuern der filtrierten Lösung fällt das neue Produkt zuerst als zähe harzige Masse aus, welche nach mehreren Stunden kristallinisch erstarrt. Die Ausbeute ist fast quantitativ. Die Substanz wurde aus ungefähr 130 Teilen heißem Wasser umkristallisiert und bildet dann farblose Blättchen, welche bei 163,5° (korr.) unter Zersetzung schmelzen.

0,3429 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0,7658 g CO_2, 0,2060 g H_2O. — 0,1259 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 13 ccm N (17°, 756 mm).

$C_{12}H_{16}O_3N_2$. Ber. C 61,01, H 6,77, N 11,86.
Gef. „ 60,91, „ 6,72, „ 12,09.

Die Substanz ist in heißem Alkohol ziemlich leicht, in Äther recht schwer, in Alkalien und Alkalicarbonaten leicht löslich.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2454 [1899]. (*S. 90.*)

Isopropylphenylhydantoïn,

$$OC\begin{cases}NH\text{———}CH.CH(CH_3)_2\\N(C_6H_5).CO\end{cases}.$$

Das Phenylcyanatderivat wird in 25 Teilen Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 heiß gelöst und die Lösung auf die Hälfte eingedampft. Beim Abkühlen fällt das Hydantoïn in feinen, langen Nadeln aus. Für die Analyse wurde es aus der ätherischen Lösung mittels Petroläther gefällt und bei 100° getrocknet:

0,3461 g Sbst.: 0,8364 g CO_2, 0,2067 g H_2O. — 0,2902 g Sbst.: 32,2 ccm N (17°, 757 mm).

$C_{12}H_{14}O_2N_2$. Ber. C 66,05, H 6,42, N 12,84.
Gef. „ 65,91, „ 6,68, „ 13,00.

Schmp. 124—125° (korr.). In heißem Wasser ist es recht schwer, in Alkohol und Äther dagegen leicht löslich. Durch Alkali wird es in der Hitze sofort, in der Kälte etwas langsamer in die Hydantoïnsäure zurückverwandelt.

II. *α*-Amino-*n*-valeriansäure,

$CH_3.CH_2.CH_2.CH(NH_2).COOH$.

Die Säure wurde von Lipp aus normalem Butyraldehyd [1]) gewonnen. Seitdem die normale Valeriansäure käuflich ist, scheint mir die Darstellung aus der Bromverbindung bequemer zu sein. Die *α*-Brom-*n*-valeriansäure ist eine farblose Flüssigkeit, welche unter 10 mm Druck bei 67° siedet.

Die Umwandlung in die Aminosäure wurde in der zuvor beschriebenen Weise ausgeführt. Die Ausbeute betrug 60—62% der Theorie. Für die Analyse war das Präparat aus heißem Wasser umkristallisiert und bei 110° getrocknet.

0,2831 g Sbst.: 29,4 ccm N (18°, 754 mm). — 0,3072 g Sbst.: 0,5763 g CO_2, 0,2606 g H_2O.

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28, H 9,40, N 11,95.
Gef. „ 51,16, „ 9,49, „ 12,07.

Die Aminosäure löst sich bei 15° in 9,3 Teilen Wasser. Aus heißem Wasser, in welchem sie viel leichter löslicher ist, kristallisiert sie in farblosen Blättchen, die beim raschen Erhitzen in geschlossenem Kapillarrohr unter Zersetzung gegen 291,5° (korr.) schmelzen. Im übrigen verweise ich auf die ausführliche Beschreibung von Lipp.

Die folgenden Derivate wurden ebenso wie bei der vorhergehenden Säure dargestellt.

---

[1]) Ann. d. Chem. **211**, 359 [1882].

Äthylester.

Ausbeute 66%. Siedepunkt bei 8 mm Druck 68,5° (korr.); spez. Gewicht 0,9447 $\left(\frac{15^0}{4^0}\right)$.

0,1713 g Sbst.: 14,4 ccm N (18°, 752 mm). — 0,2130 g Sbst.: 0,4515 g CO_2, 0,1999 g H_2O.

$C_7H_{15}O_2N$. Ber. C 57,92, H 10,34, N 9,65.
Gef. „ 57,81, „ 10,50, „ 9,81.

Das Pikrat, aus Wasser umkristallisiert, schmilzt bei 115,6° (korr.).

Benzoyl-α-amino-n-valeriansäure.

Bei der Darstellung aus der Aminosäure mit Benzoylchlorid und Bicarbonat betrug die Ausbeute 60% der Theorie. Noch leichter erhält man das Benzoylderivat aus dem Ester[1]), wenn man ihn in der 6-fachen Menge Wasser löst und 5/4 Mol.-Gew. Bicarbonat und 5/4 Mol.-Gew. Benzoylchlorid unter starkem Schütteln allmählich bei gewöhnlicher Temperatur zufügt. Dabei scheidet sich der benzoylierte Ester als Öl ab, welches durch Kochen mit verdünnter Kalilauge verseift werden kann. Beim Ansäuern fällt die Benzoylaminovaleriansäure aus, welche von der kleinen Menge anhaftender Benzoësäure durch Lösen in Äther und Fällen mit Ligroïn leicht befreit werden kann. Die Ausbeute beträgt hier 93% der Theorie, berechnet auf den Äthylester.

0,1872 g Sbst.: 0,4556 g CO_2, 0,1139 g H_2O. — 0,1531 g Sbst.: 8,5 ccm N (16°, 756 mm).

$C_{12}H_{15}O_3N$. Ber. C 65,16, H 6,78, N 6,33.
Gef. „ 64,93, „ 6,81, „ 6,55.

Schmp. 152,5° (korr.). Löslichkeit ungefähr wie bei der vorhergehenden isomeren Säure.

Phenylisocyanat-α-amino-n-valeriansäure,
$CH_3.(CH_2)_2.CH.(NH.CO.NH.C_6H_5).COOH$.

Die Verbindung fällt aus der alkalischen Lösung als Harz aus, welches nicht erstarrt. Um sie kristallinisch zu gewinnen, wurde deshalb das Produkt zuerst durch Lösen in heißer, rauchender Salzsäure und Abdampfen in das Hydantoïn übergeführt. Dieses läßt sich leicht reinigen und durch Auflösen in warmem Alkali in die Säure zurückverwandeln.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 34, 433 [1901]. (*S. 173.*)

Wird jetzt die Flüssigkeit angesäuert, so fällt die Säure zuerst wieder harzig aus, aber erstarrt bald kristallinisch. Aus heißem Wasser umkristallisiert, bildet sie farblose Blättchen, welche bei 119° (korr.) unter Zersetzung schmelzen. Zur Analyse wurde sie in Vacuo über Schwefelsäure getrocknet.

0,2217 g Sbst.: 18 ccm $^1/_{10}$-norm.-NH_3. — 0,1873 g Sbst.: 0,4178 g CO_2, 0,1158 g H_2O.

$C_{12}H_{16}O_3N_2$. Ber. C 61,01, H 6,77, N 11,86.
Gef. „ 60,83, „ 6,92, „ 11,80.

Sehr leicht löslich in Äther, Chloroform, Aceton, schwer löslich in heißem Wasser, fast unlöslich in Ligroïn.

n-Propylphenylhydantoïn, $OC\langle{NH — CH.C_3H_7 \atop N(C_6H_5).CO}$.

In der gewöhnlichen Weise dargestellt, wird die Verbindung am besten aus Äther umkristallisiert. Schmp. 102° (korr.). Für die Analyse war sie im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2017 g Sbst.: 18,6 ccm $^1/_{10}$-norm.-NH_3. — 0,2247 g Sbst.: 0,5430 g CO_2, 0,1342 g H_2O.

$C_{12}H_{14}O_2N_2$. Ber. C 66,05, H 6,42, N 12,84.
Gef. „ 65,78, „ 6,68, „ 13,01.

Die Löslichkeit ist ähnlich wie bei der vorigen isomeren Verbindung.

III. α-Aminomethyläthylessigsäure, ${CH_3 \atop C_2H_5}\rangle C(NH_2).COOH$.

Für die Bereitung dieser Säure diente das schon von Böcking dargestellte Cyanhydrin des Methyläthylketons[1]). 72 g Methyläthylketon (1 Mol.) werden mit 40 ccm wasserfreier Blausäure (etwas mehr als 1 Mol.) im verschlossenen Rohr 24 Stunden auf 80° erwärmt, dann der geringe Überschuß der Blausäure im Vakuum bei 20° abgedampft und das rückständige Öl mit 200 ccm 5-fach normaler, absolut alkoholischer Ammoniaklösung (1 Mol.) unter guter Kühlung allmählich versetzt. Die Mischung bleibt dann drei Tage bei gewöhnlicher Temperatur in verschlossenem Gefäße stehen und wird schließlich 5 Stunden auf 45° erhitzt. Nach dem Abkühlen in einer Kältemischung gießt man sie allmählich in das gleiche Volumen Salzsäure vom spez. Gew. 1,19, welche ebenfalls sehr stark abgekühlt ist. Soll die Ausbeute gut werden, so darf bei dieser Operation kein Niederschlag entstehen, dessen Erscheinen den anormalen Verlauf der Verseifung anzeigt. Nachdem das

[1]) Ann. d. Chem. **204**, 18 [1880].

saure Gemisch 24 Stunden gestanden hat, wird es noch mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und abermals 24 Stunden aufbewahrt. Dann fügt man dasdoppelte Volumen Wasser hinzu und verdampft auf dem Wasserbade zur Trockene. Den Rückstand löst man in etwa 2 L Wasser und kocht mit einem Überschuß von gewöhnlichem Bleioxyd, bis das Ammoniak ausgetrieben und das Chlor ganz gefällt ist, was meist erst nach 10—15 Stunden gelingt. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff gefällt und das Filtrat von dem Schwefelblei zur Trockne verdampft. Die Ausbeute an Aminosäure betrug 60% der Theorie, berechnet auf das angewandte Keton.

Zur Reinigung fällt man die Säure aus konzentrierter, wässeriger Lösung durch Zusatz von heißem Alkohol, wobei sie als leichtes lockeres Pulver ausfällt, welches unter dem Mikroskop als kleine Prismen erscheint.

0,2731 g Sbst. (bei 105° getrocknet): 0,5116 g CO_2, 0,2334 g H_2O. — 0,1881 g Sbst.: 19,5 ccm N (19°, 758 mm).

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28, H 9,40, N 11,95.
Gef. „ 51,09, „ 9,56, „ 12,07.

Die Säure sublimiert im offenen Rohr gegen 300°. Im geschlossenen Kapillarrohr schmilzt sie bei 307,5° (korr.). Sie löst sich in 2,57 Teilen Wasser bei 20°. Von absolutem Alkohol verlangt sie beim Kochen 15 Teile und bei 15° 170 Teile zur Lösung.

Die wässerige Lösung schmeckt süßer als die von Glykocoll. Durch die große Löslichkeit, besonders in Alkohol, unterscheidet sie sich von den beiden anderen α-Aminovaleriansäuren. Nicht minder charakteristisch ist das Kupfersalz, welches durch Kochen der wässerigen Lösung mit Kupferoxyd leicht bereitet werden kann. Es ist nicht allein in Wasser, sondern auch in Alkohol leicht löslich und wird aus der alkoholischen Lösung durch Zusatz von Äther als ein blaues Pulver gefällt. Beim langsamen Verdunsten der wässerigen oder alkoholischen Lösung bildet es ziemlich große Blättchen. Die lufttrocknen Kristalle enthalten 3 Mol. Wasser, welches bei 110° völlig entweicht.

1,8700 g Sbst.: 0,4330 g CuO, 0,2840 g H_2O.

$(C_5H_{10}O_2N)_2 Cu + 3 H_2O$. Ber. Cu 18,19, H_2O 15,44.
Gef. „ 18,48, „ 15,19.

Äthylester, $(CH_3)(C_2H_5)C(NH_2).COOC_2H_5$.

Ausbeute 60% der Theorie. Sdp. 65—66° bei 20 mm Druck.

0,2199 g Sbst.: 18,4 ccm N (21°, 760 mm). — 0,1871 g Sbst.: 0,3959 g CO_2, 0,1741 g H_2O.

$C_7H_{15}O_2N$. Ber. C 57,93, H 10,34, N 9,65.
Gef. „ 57,70, „ 10,41, „ 9,73.

Das Pikrat des Esters kristallisiert aus Wasser in Blättchen. Schmp. 115—116°.

Benzoyl-α-aminomethyläthylessigsäure.

Bei der Darstellung aus der freien Säure mit Benzoylchlorid und Natriumcarbonat betrug die Ausbeute nur 20—30%. Bei Anwendung des Esters stieg sie bis auf 95%, berechnet auf den angewendeten Ester. Für die Analyse war das Präparat aus heißem Wasser umkristallisiert und bei 110° getrocknet.

0,1893 g Sbst.: 10,3 ccm N (24°, 749 mm). — 0,3179 g Sbst.: 0,7576 g CO_2, 0,1949 g H_2O.

$C_{12}H_{15}O_3N$. Ber. C 65,16, H 6,78, N 6,33.
Gef. „ 65,00, „ 6,86, „ 6,16.

Schmp. 198—199° (korr.). Die Verbindung löst sich ungefähr in 300 Teilen kochendem Wasser, ist in Äther schwer löslich, ziemlich leicht in heißem Alkohol.

Phenylisocyanat-α-aminomethyläthylessigsäure.

Das Rohprodukt fällt beim Ansäuern der alkalischen Lösung sofort kristallinisch aus. Ausbeute 80—90% der Theorie. Für die Analyse war es aus heißem Wasser umkristallisiert.

0,1972 g Sbst.: 20,6 ccm N (24°, 758 mm). — 0,1750 g Sbst.: 0,3902 g CO_2, 0,1081 g H_2O.

$C_{12}H_{16}O_3N_2$. Ber. C 61,01, H 6,77, N 11,86.
Gef. „ 60,81, „ 6,94, „ 11,99.

Die Verbindung schmilzt unter Zersetzung bei 179—180° (korr.).

Methyläthylphenylhydantoin,

$$OC\begin{matrix}\diagup NH \text{———} C(CH_3).C_2H_5 \\ \diagdown N(C_6H_5).\dot{C}O\end{matrix}.$$

Für die Analyse bei 100° getrocknet:

0,1983 g Sbst.: 0,1167 g H_2O, 0,4794 g CO_2. — 0,2131 g Sbst.: 24,3 ccm N (22°, 748 mm).

$C_{12}H_{14}O_2N_2$. Ber. C 66,05, H 6,42, N 12,84.
Gef. „ 65,94, „ 6,59, „ 12,96.

Die Verbindung schmilzt bei 118° (korr.). Sie kristallisiert aus verdünntem Alkohol in langen Nadeln.

IV. β-Aminoisovaleriansäure, $(CH_3)_2C(NH_2).CH_2.COOH$.

Diese Säure wurde zuerst von Heintz[1]) durch Oxydation von Diacetonamin mittels Chromsäure dargestellt. Viel bequemer erhält man sie durch Addition von Ammoniak an die Dimethylacrylsäure, welche bekanntlich leicht aus dem Ester der α-Bromisovaleriansäure durch längeres Erhitzen mit Diäthylanilin gewonnen wird. 50 g Dimethylacrylsäure werden mit 500 g wässeriger Ammoniaklösung (spez. Gewicht 0,892) im Autoklaven 18 Stunden auf 150° erhitzt, dann die hellbraune Flüssigkeit nach dem Aufkochen, wenn nötig, filtriert, hierauf nach Zusatz von 15 g Baryumhydroxyd bis zum Verschwinden des Ammoniaks gekocht, nach dem genauen Ausfällen des Baryts mit Schwefelsäure in der Hitze mit Tierkohle entfärbt und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in heißem, absolutem Alkohol gelöst und mit Äther gefällt. Die Ausbeute betrug 92% der Theorie. Unter diesen Umständen kristallisiert die Säure ohne Wasser. Zur Analyse war sie bei 130° getrocknet.

0,2731 g Sbst.: 0,5116 g CO_2, 0,2334 g H_2O. — 0,1881 g Sbst.: 19,5 ccm N (19°, 758 mm).

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28, H 9,40, N 11,95.
Gef. „ 51,09, „ 9,36, „ 12,07.

Den Schmelzpunkt fand ich für die wasserfreie Säure ebenso wie Heintz bei 217° (korr.); auch die übrigen Eigenschaften stimmen mit seiner ausführlichen Beschreibung überein. Insbesondere habe ich das Kupfersalz analysiert und ebenfalls die von Heintz angegebene Formel bestätigt gefunden.

Die Anlagerung von Ammoniak findet also bei der Dimethylacrylsäure in derselben Stellung wie bei der Acryl- und Crotonsäure statt.

Äthylester.

Die Ausbeute betrug 84% der Theorie. Sdp. 75° bei 22 mm und 170° bei 760 mm Druck. Spez. Gewicht 0,8165 $\left(\frac{20^0}{4^0}\right)$. In jeder Beziehung dem β-Aminobuttersäureester[2]) analog.

0,2271 g Sbst.: 0,4810 g CO_2, 0,2134 g H_2O. — 0,3002 g Sbst.: 17,1 ccm $^1/_{10}$-norm.-NH_3=0,0291 g N.

$C_7H_{15}O_2N$. Ber. C 57,93, H 10,34, N 9,67.
Gef. „ 57,76, „ 10,51, „ 9,68.

Das sehr hygroskopische Hydrochlorat des Esters schmilzt bei 75°.

---

[1]) Ann. d. Chem. **198**, 51 [1879].

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 3755 [1901].

Benzoyl-β-aminoisovaleriansäure.

In der gewöhnlichen Weise dargestellt und aus Wasser umkristallisiert, bildet die Säure schiefe Blättchen, welche bei 141,5° schmelzen. Sie löst sich in ungefähr 70 Teilen kochendem Wasser und fällt beim Erkalten rasch aus. In Äther ist sie verhältdismäßig leicht, in Ligroïn äußerst schwer löslich. Ausbeute 62%.

0,3711 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0,8842 g CO_2, 0,2280 g H_2O. — 0,1570 g Sbst.: 8,7 ccm N (20°, 759 mm).

$C_{12}H_{15}O_3N$. Ber. C 65,16, H 6,78, N 6,30.
Gef. „ 64,98, „ 6,87, „ 6,50.

Phenylisocyanat-β-aminoisovaleriansäure, $(CH_3)_2C(NH.CO.NH.C_6H_5).CH_2.COOH$.

In der gewöhnlichen Weise dargestellt. Die Ausbeute betrug 85% der Theorie. Die Verbindung löst sich in 80 Teilen kochendem Wasser, sehr schwer in kaltem Wasser und Äther, dagegen leicht in Alkohol und starker Salzsäure. Kristallisiert aus Wasser in Nadeln, die bei 137° (korr.) schmelzen.

0,3418 g Sbst. (im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet): 0,7634 g CO_2, 0,2102 g H_2O. — 0,1884 g Sbst.: 20 ccm N (24°, 744 mm).

$C_{12}H_{16}O_3N_2$. Ber. C 61,01, H 6,77, N 11,86.
Gef. „ 60,91, „ 6,88, „ 11,94.

Beim Kochen mit Salzsäure verwandelt sie sich in ihr Anhydrid, das 1-Phenyl-4-dimethylhydrouracil,

$$OC\left<\begin{matrix}N(C_6H_5)\text{———}CO\\NH\text{———}C(CH_3)_2\end{matrix}\right>CH_2$$ [1].

Die Phenylcyanat-β-aminoisovaleriansäure wird in der 5-fachen Menge Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) gelöst und 10 Minuten gekocht. Beim Erkalten kristallisiert das Anhydrid aus und wird durch Umlösen aus heißem Alkohol in langen, farblosen Nadeln erhalten, welche für die Analyse im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

0,1811 g Sbst.: 0,4377 g CO_2, 0,1085 g H_2O. — 0,2737 g Sbst.: 20,5 ccm $^1/_{10}$-norm.-NH_3=0,0349 g N.

$C_{12}H_{14}O_2N_2$. Ber. C 66,05, H 6,42, N 12,84.
Gef. „ 65,91, „ 6,70, „ 12,81.

Schmp. 237° (korr.) unter Zersetzung. In Wasser und Äther sehr schwer, in heißem Alkohol leicht löslich.

---

[1]) Die Reaktion ist ganz analog der von E. Fischer und Roeder beobachteten Bildung eines Uracilderivates aus β-Aminobuttersäureester und Kaliumcyanat; vgl. Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 3756 [1901].

8. A. Mouneyrat: Verwandlung der α-Aminosäuren in Phenylhydantoïne.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 33, 2393 (1900).
(Eingegangen am 13. August.)

Die α-Aminosäuren lassen sich nach der Beobachtung von Paal[1]) in alkalischer Lösung mit Phenylcyanat zu sogenannten Phenylureïdosäuren vereinigen. Aus dem Glykocoll entsteht z. B. die Phenylureïdoessigsäure,

$$\begin{array}{l} CH^2.COOH \\ \dot{N}H.CO.NH.C_6H_5 \end{array}.$$

Diese ist aber nichts anderes als eine Phenylhydantoïnsäure. Man durfte deshalb erwarten, daß diese und ähnliche Verbindungen durch Wasserabspaltung in die entsprechenden Hydantoïne übergehen würden. In der Tat läßt sich diese Reaktion, wie ich gefunden habe, sehr leicht durch Kochen der Phenylureïdosäuren mit verdünnter Salzsäure (25-prozentig) ausführen. Das aus dem Glykocoll erhaltene Phenylhydantoïn hat die Struktur:

$$\begin{array}{l} CH_2.CO \\ \dot{N}H.CO \end{array}\!\!>\!N.C_6H_5.$$

und ist identisch mit dem von Guareschi[2]) aus Glycin und Phenylharnstoff erhaltenen Produkt. Analoge Verbindungen erhielt ich aus dem racemischen Alanin, der α-Aminobuttersäure, dem Leucin und dem β-Phenylalanin.

γ-Phenylhydantoïn.

2 g Phenylureïdoessigsäure, welche nach der Vorschrift von Paal dargestellt war, werden in 160 g Salzsäure (spez. Gewicht 1,124) heiß gelöst und dann die Flüssigkeit auf $^1/_4$ ihres Volumens eingekocht. Beim Erkalten scheidet sich das Phenylhydantoïn in prächtigen Nadeln ab.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 27, 974.
[2]) Beilsteins Handbuch II, 383.

Die Mutterlauge gibt beim Verdampfen noch eine ziemlich beträchtliche Kristallisation. Die Gesamtausbeute beträgt 90—95% der Theorie. Zur Reinigung wurde die Verbindung aus der 50-fachen Menge Wasser umkristallisiert.

0,2027 g Sbst.: 0,4560 g CO_2, 0, 0843 g H_2O. — 0,2080 g Sbst.: 29,3 ccm N (21⁰, 750 mm).

$C_9H_8O_2N_2$. Ber. C 61,37, H 4,55, N 15,90.
Gef. „ 61,35, „ 4,62, „ 15,82.

Sie schmilzt bei 159—160⁰ (korr.), während Guareschi 154—155⁰ angegeben hat. In Alkohol, Aceton und heißem Benzol ist sie leicht, in Äther aber nur wenig löslich. Von konzentrierten Mineralsäuren wird sie ebenfalls leicht gelöst.

Phenylmethylhydantoin, $\begin{matrix} CH_3.CH.CO \\ NH.CO \end{matrix} > N.C_6H_5$.

Dasselbe wird genau so wie die vorhergehende Verbindung aus der zuerst von Kühn[1]) beschriebenen und bequemer nach der Vorschrift von Paal zu erhaltenden α-Phenylureïdopropionsäure gewonnen. Da es in Wasser viel weniger löslich ist als das Phenylhydantoïn, so wird es zur Reinigung in heißem Alkohol (ungefähr 20-fache Menge) gelöst und durch Wasser gefällt.

Die so erhaltenen, schönen Nadeln wurden für die Analyse bei 100⁰ getrocknet:

0,2004 g Sbst.: 0,4636 g CO_2, 0,0961 g H_2O. — 0,1982 g Sbst.: 25,7 ccm N (20⁰, 756 mm).

$C_{10}H_{10}O_2N_2$. Ber. C 63,15, H 5,26, N 14,73.
Gef. „ 63,09, „ 5,32, „ 14,70.

Die Verbindung schmilzt bei 172—173⁰ (korr.). Kühn glaubt dieselbe schon unter Händen gehabt zu haben; er konnte sie aber nicht isolieren, sondern mußte sich damit begnügen, aus dem Rohprodukt durch Alkali die entsprechende Hydantoïnsäure darzustellen.

Phenyläthylhydantoïn, $\begin{matrix} C_2H_5.CH.CO \\ NH.CO \end{matrix} > N.C_6H_5$.

Die entsprechende, bisher nicht bekannte Hydantoïnsäure entsteht sehr leicht nach dem Verfahren von Paal.

Man löst 2,24 g racemische α-Aminobuttersäure in der berechneten

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 2884.

Menge (25 ccm) Normal-Natronlauge, kühlt auf 0° ab und fügt in kleinen Portionen unter heftigem Umschütteln die berechnete Menge 2,3 g Phenylcyanat hinzu. Die Flüssigkeit wird dann durch Tierkohle geklärt, das Filtrat mit Salzsäure übersättigt und die ausgefällten feinen Nadeln aus der 50-fachen Menge heißem Wasser umkristallisiert.

Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 95% der Theorie.

Die Phenyläthylhydantoïnsäure schmilzt unter Gasentwickelung bei 170° (korr.). Sie ist leicht löslich in Alkohol, Aceton, wenig löslich in Äther und kaltem Wasser.

Für die Analyse wurde sie bei 100° getrocknet:

0,2031 g Sbst.: 0,4435 g CO_2, 0,1145 g H_2O.

$C_{11}H_{14}O_3N_2$. Ber. C 59,48, H 6,30.
Gef. „ 59,55, „ 6,30.

Die Umwandlung in das Hydantoïn geht unter denselben Bedingungen und mit der gleichen Ausbeute wie in den vorhergehenden Fällen vonstatten. Das Produkt wurde durch Lösen in heißem Alkohol und Fällen mit Wasser gereinigt und für die Analyse bei 100° getrocknet:

0,2008 g Sbst.: 0,4747 g CO_2, 0,1020 g H_2O. — 0,1993 g Sbst.: 24,4 ccm N (21°, 749 mm).

$C_{11}H_{12}O_2N_2$. Ber. C 64,71, H 5,88, N 13,72.
Gef. „ 64,47, „ 5,65, „ 13,73.

Die Verbindung schmilzt unter Zersetzung bei 126—127° (korr.). Sie ist selbst in heißem Wasser schwer löslich, löst sich aber leicht in heißem Alkohol und Aceton.

Phenylisobutylhydantoïn, $(CH_3)_2CH.CH_2.\underset{\displaystyle NH.CO}{CH.CO}\!\!>\!N.C_6H_5$.

Dasselbe wird aus der auf S. 129 von E. Fischer beschriebenen Verbindung des Phenylcyanats mit dem Leucin gewonnen, zur Reinigung in etwa 25 Teilen kochendem Alkohol gelöst und durch Wasser gefällt. Für die Analyse war es bei 100° getrocknet.

0,2003 g Sbst.: 0,4951 g CO_2, 0,1253 g H_2O. — 0,2043 g Sbst.: 21,6 ccm N (20°, 755 mm).

$C_{13}H_{16}O_2N_2$. Ber. C 67,24, H 6,89, N 12,07.
Gef. „ 67,43, „ 6,95, „ 12,01.

Phenylbenzylhydantoïn, $C_6H_5.CH_2.\underset{\displaystyle NH.CO}{CH.CO}\!\!>\!N.C_6H_5$.

Die entsprechende Hydantoïnsäure, welche aus Phenylisocyanat und dem aktiven Phenylalanin entsteht, ist schon in der vorhergehenden Abhandlung von E. Fischer und mir (S. 135) beschrieben worden.

Der Racemkörper wird unter denselben Bedingungen und mit derselben Ausbeute erhalten und schmilzt gegen 182° unter Zersetzung.

Für die Umwandlung in das Hydantoïn wurde die Substanz wegen ihrer Schwerlöslichkeit mit der 400-fachen Menge verdünnter Salzsäure (1,124) ½ Stunde lang gekocht. Beim Erkalten fiel dann das Hydantoïn in Nadeln aus, welche in heißem Alkohol gelöst, mit Tierkohle entfärbt und mit Wasser gefällt wurden. Wenn die salzsauren Mutterlaugen verarbeitet werden, so ist auch hier die Ausbeute fast quantitativ. Für die Analyse war bei 100° getrocknet:

0,2028 g Sbst.: 0,5370 g CO_2, 0,0985 g H_2O. — 0,2071 g Sbst.: 19,1 ccm N (20°, 757 mm).

$C_{16}H_{14}O_2N_2$. Ber. C 72,18, H 5,26, N 10,45.
Gef. „ 72,21, „ 5,39, „ 10,53.

Die Substanz schmilzt bei 173—174° (korr.). Sie bildet schöne Nadeln, welche in Wasser sehr wenig, in heißem Alkohol und Aceton recht leicht löslich sind.

9. Emil Fischer: Über die Ester der Aminosäuren[1]).

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 34, 433 (1901).
(Eingegangen am 12. Februar.)

Wie Th. Curtius[2]) vor längerer Zeit gezeigt hat, lassen sich die Ester des Glykocolls, welche man zwar früher schon durch Einwirkung von Jodalkyl und Alkohol erhalten, aber nur in Form ihrer Salze isoliert hatte, viel leichter durch Alkohol und Salzsäure bereiten, und die freien Ester werden aus den Hydrochloraten durch die berechnete Menge Silberoxyd als unzersetzt destillierende, stark basische Flüssigkeiten gewonnen. Er wandte das gleiche Verfahren auf das Alanin, Leucin, Tyrosin, die Aminomalonsäure und die Asparaginsäure an, begnügte sich aber hier mit der Isolierung der Hydrochlorate, welche ihm als Rohmaterial für seine bekannten Studien über aliphatische Diazoverbindungen dienten.

Aus den Beobachtungen von Curtius über den Glykocolläthylester, der als Typus der ganzen Klasse gelten kann, sind zwei Verwandlungen hervorzuheben. Die eine findet in wässeriger Lösung statt und führt zum sogenannten Glycinanhydrid, für welches Curtius und Schulz später die bimolekulare Formel $C_4H_6N_2O_2$ ermittelten[3]).

Die andere erfolgt beim bloßen Stehen des Esters und liefert ein Produkt, welches die Biuretreaktion zeigt und beim Kochen mit Wasser zum Teil in eine leimähnliche Substanz übergeht.

Über die Ester der kohlenstoffreicheren Aminosäuren liegen sonst nur dürftige Angaben vor. Tafel[4]) hat das Hydrochlorat des γ-Aminovaleriansäureäthylesters beschrieben. Lilienfeld[5]) erwähnt kurz, daß er den Äthylester des Leucins und Tyrosins nach dem Verfahren von

[1]) Der Berliner Akademie vorgelegt am 29. November 1900. Siehe Sitzungsberichte **1900**, 1062.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **16**, 753 [1883], **17**, 953 [1884]; ferner Curtius und Goebel, Journ. für prakt. Chem. **37**, 150 [1888].

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **23**, 3041 [1890].

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **22**, 1862 [1889].

[5]) Dubois' Archiv für Physiol. **1894**, 383, 555.

Curtius dargestellt habe. Ferner hat Röhmann[1]) den salzsauren Leucin-Äthylester und -Methylester bereitet und zur Reinigung bzw. Identifizierung eines Leucins benutzt. Endlich haben Weidel und Roithner[2]) das Hydrochlorat des β-Aminopropionsäureäthylesters dargestellt.

Bei der großen Bedeutung, welche die Aminosäuren als Spaltungsprodukte der Proteïnstoffe besitzen, hielt ich eine erneute Untersuchung ihrer Ester für wünschenswert, um bessere Methoden für die Reinigung und Trennung der Aminosäuren sowie für die Bereitung ihrer Derivate zu gewinnen.

Der erste Schritt auf diesem Wege ist mir gelungen durch eine wesentliche Vereinfachung in der Darstellung der freien Ester. Das Verfahren von Curtius, die Hydrochlorate durch die genau äquivalente Menge Silberoxyd zu zerlegen, ist nicht allein kostspielig, sondern hat den viel größeren Nachteil, daß man die Salze isolieren muß, um die Menge des Oxyds richtig zu wählen. Diese Bedingung ist aber in allen Fällen, wo es sich um komplizierte Gemische handelt, gar nicht zu erfüllen.

Sehr viel einfacher erreicht man dasselbe Ziel durch Alkali in konzentrierter wässeriger Lösung. Durch gute Abkühlung läßt sich die Verseifung der Ester vermeiden, und fügt man hinterher noch trocknes Kaliumcarbonat zu, so lassen sich auch die ganz leicht löslichen Produkte so vollständig ausäthern, daß die Ausbeuten fast ebensogut sind, wie bei der Anwendung von Silberoxyd. Auf diese Weise habe ich die neutralen Äthylester des Glykocolls, Sarcosins, Alanins, der α-Aminobuttersäure, des *l*- und *r*-Leucins, der racemischen α-Aminonormalcapronsäure, des Phenylalanins, des Tyrosins, der *l*-Asparaginsäure und der *d*-Glutaminsäure dargestellt.

Die Diaminosäuren konnten bisher aus Mangel an Material nicht geprüpft werden; ich beabsichtige aber, diese Versuche nachzuholen.

Die Ester der Monoaminosäuren sind, mit Ausnahme des schön kristallisierten Tyrosinderivates, alkalisch reagierende Flüssigkeiten, welche sämtlich unter vermindertem Druck unzersetzt destillieren und deren Löslichkeit in Wasser mit steigendem Molekulargewicht abnimmt. Auffallend leicht löslich in reinem Wasser sind die Derivate der Asparagin- und Glutaminsäure. Auch im Siedepunkt bestehen, selbst bei stark vermindertem Druck, so erhebliche Differenzen, daß Gemenge durch fraktionierte Destillation zerlegt werden können. Besonders eignen sich diese Ester auch zur Isolierung der Aminosäuren

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **30**, 1980 [1897].

[2]) Monatsh. für Chem. **17**, 179 [1896].

aus komplizierten Gemischen, und ich zweifle nicht daran, daß man sie in Zukunft bei Studien über die hydrolytische Spaltung der Proteïnstoffe zur Erkennung und Reinigung von Aminosäuren benutzen wird; denn letztere können sehr leicht aus den Estern durch Kochen mit Wasser bzw. Barythydrat regeneriert werden und außerdem lassen sich die Ester selbst durch den Siedepunkt, die verschiedene Löslichkeit in Wasser oder durch den Schmelzpunkt der meist schön kristallisierenden Pikrate unterscheiden. Die Vorteile des Verfahrens werde ich später speziell bei der Beschreibung des Leucinesters zeigen.

In den Estern ist die Aminogruppe ebenso reaktionsfähig wie in den gewöhnlichen Aminen, und da die Ester außerdem zum Unterschied von den freien Säuren in Alkohol, Äther, Benzol leicht löslich sind, so erscheinen sie für die Bereitung von zahlreichen Derivaten der Aminosäuren besonders geeignet. Ich habe mich überzeugt, daß sie mit Säureanhydriden, Säurechloriden, Halogenalkylen, Isocyanaten, Senfölen, Aldehyden, Ketonen, Schwefelkohlenstoff, Phosgen energisch reagieren, so daß sie voraussichtlich bei allen Verwandlungen, welche für die einfachen primären Amine bekannt sind, denselben substituiert werden können. Einige Beispiele dafür werde ich bei der Beschreibung des Glykocollesters geben. Besonders leicht verwandeln sich die Ester auch unter Abgabe von Alkohol in Produkte, die dem Glycinanhydrid entsprechen. Curtius hat die Verwandlung beim Glykocollester in wässeriger Lösung beobachtet. Bei den Homologen tritt unter diesen Bedingungen nur Verseifung zu den Aminosäuren ein, sehr glatt erfolgt aber die Bildung der Anhydride beim Erwärmen in geschlossenen Gefäßen auf 170—180⁰, so daß dies zweifellos die beste Darstellung für die Produkte ist. Mehrere Repräsentanten der Körperklasse sind längst bekannt. Am ältesten ist wohl das sogenannte Leucinimid, welches zuerst von Bopp[1]) 1849 beobachtet und später auch künstlich aus dem Leucin durch Erhitzen im Kohlensäure-[2]) oder im Salzsäure-Strom[3]) erhalten wurde. Ich werde unten zeigen, daß es am leichtesten aus dem Leucinester bereitet wird. Nächstdem wurde das entsprechende Derivat des Alanins[4]) durch Erhitzen der Aminosäure im Salzsäurestrom dargestellt und unter dem Namen Lactimid, beschrieben. Ihm folgten das Anhydrid des Phenylglykocolls von P. J. Meyer[5]) und das Phenyllactimid, von Erlenmeyer und Lipp[6]) bei der trocknen Destillation des Phenylalanins

[1]) Ann. d. Chem. **69**, 28 [1849].

[2]) Hesse und Limpricht, Ann. d. Chem. **116**, 201 [1860].

[3]) Kohler, Ann. d. Chem. **134**, 367 [1865].

[4]) Preu, Ann. d. Chem. **134**, 372 [1865].

[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **10**, 1967 [1877].

[6]) Ann. d. Chem. **219**, 206 [1883].

erhalten, für welche schon von den Entdeckern vermutungsweise die Formeln

$$\begin{matrix} CH_2.N(C_6H_5).CO \\ \dot{C}O.N(C_6H_5).\dot{C}H_2 \end{matrix} \quad \text{bzw.} \quad \begin{matrix} C_6H_5.CH_2.CH.NH.CO \\ \dot{C}O.NH.\dot{C}H.CH_2.C_6H_5 \end{matrix}$$

aufgestellt wurden.

Daß das Sarcosin beim Erhitzen zum Teil in Anhydrid übergeht, wurde von F. Mylius[1]) beobachtet. Er war auch der erste, welcher für die Verbindung die Strukturformel

$$\begin{matrix} CO.N(CH_3).CH_2 \\ \dot{C}H_2.N(CH_3).\dot{C}O \end{matrix}$$

durch Aufspaltung in Dimethyloxamid und Oxalsäure bei der Oxydation mit Permanganat in überzeugender Weise begründete.

Leider hat er versäumt, die Analogie seines Körpers mit dem Leucinimid und Lactimid hervorzuheben und dadurch die Natur der ganzen Klasse klarzustellen. Dies ist aber ebensowenig von Curtius geschehen, welcher das Anhydrid des Glykocolls schon vorher entdeckte, vier Jahre später genau beschrieb und endlich dafür auch nach Feststellung des Molekulargewichtes vermutungsweise die Strukturformel

$$HN\left\langle\begin{matrix} CO.CH_2 \\ CH_2.CO \end{matrix}\right\rangle NH$$

aufstellte[2]).

Dagegen hat R. Cohn[3]), der sich zuletzt mit dem Leucinimid beschäftigte und nicht allein sein Molekulargewicht bestimmte, sondern auch die Reduktion mit Natrium und Alkohol studierte und durch seine Resultate zu der Strukturformel

$$\begin{matrix} C_4H_9.CH.NH.CO \\ \quad\quad \dot{C}O.NH.\dot{C}H.C_4H_9 \end{matrix}$$

geführt wurde, auf die Analogie mit den Derivaten des Alanins und Glykocolls hingewiesen.

Das Leucinimid ist also offenbar der älteste Repräsentant der Klasse, für welche besonders zahlreiche Glieder in der aromatischen Reihe von Bischoff, Widmann, Kossel u. a. dargestellt wurden, und welche man jetzt gewöhnlich α-, γ- oder 2,5-Diacipiperazine nennt.

Die Derivate der aliphatischen Aminosäuren, mit Ausnahme des Glykocolls, werden nach meiner Erfahrung am leichtesten durch län-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 286 [1884].

[2]) a. a. O.

[3]) Zeitsch. für physiol. Chem. **29**, 283 [1900].

geres Erhitzen der Ester im geschlossenen Rohr auf 170—180° erhalten. Sie entstehen aber auch, allerdings in schlechterer Ausbeute, durch die Wirkung von Natriumäthylat auf die alkoholische Lösung der Ester, wenn man der Vorschrift folgt, welche Vorlaender[1]) für die Verwandlung des Anilinoessigsäureäthylesters in Diphenyldiacipiperazin gegeben hat.

Gewinnung des freien Glykocolläthylesters.

50 g des nach der Vorschrift von Curtius dargestellten Hydrochlorats werden mit 25 ccm Wasser übergossen, wobei nur partielle Lösung erfolgt, dann mit etwa 100 ccm Äther überschichtet und unter gleichzeitiger starker Kühlung mit 40 ccm Natronlauge (33% NaOH) versetzt. Zum Schluß fügt man noch so viel trocknes gekörntes Kaliumcarbonat zu, daß die wässerige Schicht in einen dicken Brei verwandelt wird. Nach kräftigem Umschütteln wird die ätherische Lösung abgegossen, der Rückstand noch zwei- bis dreimal mit weniger Äther durchgeschüttelt und die vereinigte ätherische Lösung nach dem Filtrieren zuerst etwa 10 Minuten mit trocknem Kaliumcarbonat und dann mit etwas Calcium- oder Baryumoxyd mehrere Stunden geschüttelt. Das scharfe Trocknen ist notwendig, wenn man den Ester wasserfrei erhalten will. Nach dem Abdampfen des Äthers wird der Rückstand destilliert. Bei 11 mm kochte derselbe konstant bei 43—44°, und es blieb nur ein sehr geringer Rückstand. Die Ausbeute betrug 52% des angewandten Hydrochlorats oder 70% der Theorie. Der Verlust ist zum Teil durch die Verflüchtigung des Esters beim Abdestillieren des Äthers bedingt. Das charakteristische Pikrat des Esters kristallisiert aus warmem Wasser in quadratischen Prismen, welche bei 154° (157° korr.) ohne Zersetzung schmelzen.

Die stark basischen Eigenschaften des Glykocollesters sind schon von Curtius hervorgehoben worden. Die nachfolgenden Beobachtungen zeigen aber weiter, daß derselbe ein vorzügliches Mittel ist, um die verschiedenartigsten Derivate des Glykocolls zu gewinnen.

Verbindung des Glykocollesters mit Acetylaceton und Acetessigester.

Dieselben entstehen aus gleichen Molekülen der Komponenten unter Abspaltung von Wasser analog den Ammoniakderivaten und haben aller Wahrscheinlichkeit nach auch dieselbe Struktur. Da eine rationelle Nomenklatur der Produkte schwierig ist, so will ich sie vorläufig durch Zusammenfügen der Namen der beiden Bestandteile bezeichnen.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2468 [1900].

Acetessigester-Glykocollester, $CH_3.C\begin{cases}CH.CO_2C_2H_5\\NH.CH_2.CO_2C_2H_5\end{cases}$.

Vermischt man 3 g Acetessigester und 2,5 g Glykocollester (gleiche Moleküle), so tritt nach einigen Minuten schwache Erwärmung ein. Nach etwa 20 Minuten trübt sich die Flüssigkeit durch Abscheidung von Wasser und erstarrt nach etwa einer Stunde kristallinisch. Man läßt zur Vervollständigung der Reaktion noch einige Stunden stehen und löst dann die kaum gefärbte Kristallmasse in warmem Petroläther. Beim Erkalten kristallisiert sie in farblosen, langen, vielfach büschelförmig verwachsenen Nadeln, und die Abscheidung ist bei 0° nach einigen Stunden so vollständig, daß die Ausbeute fast quantitativ wird.

0,2234 g Sbst.: 0,4586 g CO_2, 0,1596 g H_2O. — 0,2480 g Sbst.: 14,1 ccm N (16°, 756 mm).

$C_{10}H_{17}O_4N$. Ber. C 55,81, H 7,91, N 6,51.
Gef. „ 55,58, „ 7,93, „ 6,59.

Die Substanz schmilzt bei 53°. In Alkohol, Äther und Benzol ist sie sehr leicht, in Wasser auch in der Wärme schwer löslich und wird von heißem, verdünntem Alkali ziemlich rasch gelöst, wobei Verseifung erfolgt.

Acetylacetonglykocollester, $CH_3.C\begin{cases}CH.CO.CH_3\\NH.CH_2.CO_2C_2H_5\end{cases}$.

Vermischt man gleiche Gewichtsteile von Diketon und Ester, so tritt bald so starke Erwärmung ein, daß es bei größeren Mengen zweckmäßig ist, zu kühlen. Nach einigen Stunden ist die schwach gelbe Flüssigkeit, welche sich bald durch Wasserabscheidung trübt, kristallinisch erstarrt. Aus warmem Petroläther umkristallisiert, bildet die Verbindung lange, farblose Nadeln.

0,2037 g Sbst.: 0,4347 g CO_2, 0,1464 g H_2O. — 0,2505 g Sbst.: 16,6 ccm N (14°, 760 mm).

$C_9H_{15}O_3N$. Ber. C 58,38, H 8,11, N 7,57.
Gef. „ 58,20, „ 7,98, „ 7,79.

Die Substanz schmilzt bei 68° (korr.) und läßt sich in kleiner Menge sogar bei gewöhnlichem Druck destillieren, wobei allerdings ein Teil zerstört wird. In reinem Wasser ist sie besonders in der Wärme in erheblicher Menge löslich, wird aber leicht ausgesalzen.

In Alkohol, Äther, Benzol ist sie leicht löslich, erheblich schwerer in Petroläther. Von verdünnter, kalter Salzsäure oder Schwefelsäure wird sie sehr leicht aufgenommen und beim Erwärmen rasch zersetzt. In kalter, verdünnter Natronlauge ist sie nicht löslich. Beim Erwärmen damit geht sie aber bald, offenbar unter Verseifung, in Lösung.

Acetonylaceton und Glykocollester.

Infolge der starken Basizität verbindet sich der Glykocollester auch mit diesem Diketon schon bei gewöhnlicher Temperatur unter Wasserabspaltung und Bildung eines Pyrrolderivates.

Man vermischt zu dem Zweck gleiche Gewichtsteile von Ester und Diketon. Das Gemenge färbt sich bald gelb, erwärmt sich gelinde und trübt sich nach etwa 15 Minuten durch Abscheidung von Wasser. Zur Vervollständigung der Reaktion läßt man es 12 Stunden stehen.

Das erste Produkt, welches offenbar ein Ester ist, bildet ein schwach gelbes Öl, welches einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan intensiv rot färbt. Durch Erwärmen mit verdünntem Alkali wird es verseift und liefert dabei die

$$\alpha, \alpha'\text{-Dimethylpyrrolessigsäure, } \begin{array}{c} HC\text{—}CH \\ CH_3.\ddot{C}\quad\ddot{C}.CH_3 \\ \diagdown\diagup \\ N.CH_2.CO_2H \end{array}.$$

Zur Bereitung der Säure, welche ziemlich unbeständig ist, bedarf es einiger Vorsicht. 6 g Ester werden mit 25 ccm heißer Natronlauge von 6% einige Minuten geschüttelt, bis klare Lösung eingetreten ist und nach dem Abkühlen mit 5 ccm Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) versetzt, wobei die neue Säure erst als Öl fällt, aber bald in Nadeln oder flachen Prismen kristallisiert. Sie wird sofort filtriert und mit etwa 180 ccm Ligroïn (Sdp. 65—72°) zweimal ausgekocht, wobei eine rotbraune, schmierige Masse zurückbleibt. Beim Erkalten kristallisiert die Säure in farblosen, langen Nadeln. Die Ausbeute betrug 54% der Theorie, berechnet nach der Menge des Diketons.

Für die Analyse waren die Kristalle im Vakuum getrocknet.

0,2001 g Sbst.: 0,4583 g CO_2, 0,1276 g H_2O. — 0,2368 g Sbst.: 18,4 ccm N (13,5°, 756,5 mm).

$C_8H_{11}O_2N$. Ber. C 62,74, H 7,19, N 9,15.
Gef. „ 62,47, „ 7,08, „ 9,12.

Die reine Säure schmilzt beim raschen Erhitzen bei 130—131° zu einer roten, später braunen Flüssigkeit. In Alkohol, Äther, Chloroform ist sie spielend leicht löslich. Aus warmem Wasser, in welchem sie ziemlich leicht löslich ist, kristallisiert sie in feinen Blättchen oder seltener in Nadeln. In kaltem Wasser ist sie auch noch ziemlich löslich, wird aber daraus schon durch wenig Kochsalz gefällt. Ein mit der wässerigen

Lösung imprägnierter Fichtenspan färbt sich mit rauchender Salzsäure intensiv fuchsinrot.

Bemerkenswert ist die Unbeständigkeit an der Luft. In befeuchtetem Zustand oder in wässeriger Lösung verwandelt sie sich im Laufe von 1—2 Tagen in eine rotbraune, schmierige Masse. Ferner reduziert die wässerige Lösung ammoniakalische Silberlösung in der Hitze.

Glykocollester und Phenylsenföl.

Die stark exothermische Reaktion gibt je nach der Temperatur verschiedene Produkte. Mäßigt man den Vorgang durch Verdünnung des Glykocollesters, so entsteht durch einfache Addition der Komponenten ein leicht löslicher, niedrig schmelzender Körper, der höchstwahrscheinlich der Sulfoharnstoff $C_6H_5.NH.CS.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$ ist und dementsprechend als Phenylthiocarbamidoessigsäureäthylester zu bezeichnen wäre.

Zu seiner Bereitung löst man 1 Teil Glykocollester in 2 Teilen Äther und fügt allmählich 1,3 Teil Phenylsenföl zu. Die Flüssigkeit erwärmt sich zum Sieden und scheidet langsam das Additionsprodukt als farblose Kristallmasse ab. Es ist vorteilhaft, wenigstens 24 Stunden stehen zu lassen. Die Ausbeute beträgt dann gegen 90% der Theorie. Die Substanz wird in etwa 12 Teilen warmem Äther gelöst und die etwas eingedampfte Lösung der Kristallisation überlassen. Der Thioharnstoff scheidet sich dann in rhombenähnlichen, ziemlich dicken Tafeln ab.

0,2009 g Sbst.: 0,4075 g CO_2, 0,1069 g H_2O. — 0,2175 g Sbst.: 22,0 ccm N (14°, 759 mm).

$C_{11}H_{14}O_2N_2S$. Ber. C 55,46, H 5,88, N 11,77.
Gef. „ 55,32, „ 5,97, „ 11,89.

Die Substanz schmilzt bei 85°. Sie löst sich in Alkohol, zumal in der Wärme, sehr leicht und auch in heißem Wasser in erheblicher Menge. Von verdünnten Alkalien wird sie sofort aufgenommen; die Lösung färbt sich bald rot, und auf Zusatz von Säuren fällt wieder ein kristallinischer Niederschlag aus.

Ein dem letzten sehr ähnliches Produkt entsteht, wenn Glykocollester und Phenylsenföl ohne Verdünnungsmittel vermischt werden. Das Gemisch erwärmt sich stark, färbt sich gelbrot und scheidet nach dem Übergießen mit Alkohol ein Kristallpulver ab, dessen Menge ungefähr $1^1/_4$ vom Gewicht des Glykocollesters beträgt. Dasselbe läßt sich aus heißem Eisessig leicht umkristallisieren, bildet schwach gelbe Blättchen und löst sich leicht mit roter Farbe in Alkali.

Carbamidodiessigsäurediäthylester, $CO\langle\begin{smallmatrix}NH.CH_2.CO_2.C_2H_5\\NH.CH_2.CO_2.C_2H_5\end{smallmatrix}$.

Löst man 5 g Glykocollester in 40 ccm Benzol und fügt allmählich 6 ccm einer Phosgen-Toluollösung von 20% unter Abkühlung zu, so entsteht sofort ein starker kristallinischer Niederschlag, der filtriert und in 45 ccm heißem Wasser gelöst wird. Beim Erkalten fällt der Harnstoff aus, während salzsaurer Glykocollester in Lösung bleibt. Die Ausbeute betrug 2,1 g oder 75% der Theorie.

Für die Analyse war das Produkt im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2162 g Sbst.: 0,3690 g CO_2, 0,1352 g H_2O. — 0,2309 g Sbst.: 24,2 ccm N (14°, 756 mm).

$C_9H_{16}O_5N_2$. Ber. C 46,55, H 6,90, N 12,07.
Gef. „ 46,55, „ 6,94, „ 12,21.

Der Carbamidodiessigsäurediäthylester schmilzt bei 144° (146° korr.). Er löst sich ziemlich leicht in heißem Alkohol oder Wasser und kristallisiert beim Erkalten rasch in feinen, langen Prismen.

Beim Erwärmen mit sehr verdünnten Alkalien wird er rasch gelöst und in eine Säure verwandelt, die beim Ansäuern der nicht zu verdünnten alkalischen Lösung bald in feinen Blättern kristallisiert und wahrscheinlich die Carbamidodiessigsäure ist, aber nicht näher untersucht wurde.

Glykocollester und Schwefelkohlenstoff.

Unter lebhafter Reaktion vereinigen sie sich zu einem kristallinischen Produkt, welches in die Klasse der sulfocarbaminsauren Salze gehört und mithin folgende Struktur hat: $C_2H_5\,CO_2.CH_2.NH.CS.SH$, $NH_2.CH_2.CO_2C_2H_5$.

Die jetzt übliche Nomenklatur reicht leider nicht aus, um für diese Verbindung einen passenden Namen abzuleiten.

Vermischt man 5 g Glykocollester mit 5 ccm Äther und fügt allmählich 2 g Schwefelkohlenstoff hinzu, so kommt die Mischung ins Sieden und scheidet bald ein dickes Öl ab, welches nach dem Verdunsten des Äthers im Verlaufe von einigen Stunden kristallinisch erstarrt. Die Substanz ist in Wasser und warmem Alkohol oder Benzol leicht löslich. Für die Analyse wurde sie aus sehr wenig warmem Alkohol umkristallisiert und im Vakuum getrocknet.

0,2410 g Sbst.: 20,7 ccm N (16°, 763 mm). — 0,1889 g Sbst.: 0,3088 g $BaSO_4$.

$C_9H_{18}O_4N_2S_2$. Ber. N 9,93, S 22,69.
Gef. „ 10,05, „ 22,45.

Die Verbindung schmilzt bei 79°. Sie kristallisiert aus der sehr konzentrierten alkoholischen Lösung beim starken Abkühlen in mikroskopischen kleinen Prismen oder Nadeln. In warmem Essigester ist sie etwas schwerer als in Alkohol löslich, und von Äther wird sie sehr wenig aufgenommen. Beim Aufbewahren färbt sie sich rot. Gegen Silber- und Quecksilbersalze verhält sie sich ganz ähnlich wie das methylcarbaminsaure Methylamin. Sie gibt erst farblose Niederschläge, welche aber sehr bald, besonders beim Erwärmen, sich schwärzen unter Bildung von Schwefelmetall, während gleichzeitig der starke Geruch eines Senföls auftritt.

Durch alkoholische Jodlösung wird das sulfocarbaminsaure Salz in einen kristallisierten Körper $C_{10}H_{16}N_2O_4S_4$ verwandelt. Ich betrachte ihn als das Oxydationsprodukt der Sulfocarbaminsäure und gebe ihm deshalb die Formel:

$$C_2H_5CO_2.CH_2.NH.\underset{\substack{\cdot\cdot \\ S}}{C}.S.S.\underset{\substack{\cdot\cdot \\ S}}{C}.NH.CH_2CO_2C_2H_5\,.$$

Man löst das sulfocarbaminsaure Salz in Alkohol und fügt eine starke alkoholische Jodlösung zu, solange sie entfärbt wird. Auf Zusatz von Wasser fällt das neue Produkt in der Regel sofort als kristallinische Masse, zuweilen aber auch als Öl aus, welches später erstarrt. Die Ausbeute beträgt 65—70% der Theorie. Zur Analyse wurde die Substanz aus siedendem Ligroïn, wovon aber 300—400 Teile erforderlich sind, umkristallisiert, und die so erhaltenen langen, flachen Nadeln oder Spieße im Vakuum getrocknet.

0,1947 g Sbst.: 0,2425 g CO_2, 0,0771 g H_2O. — 0,2160 g Sbst.: 14,4 ccm N (15°, 765 mm). — 0,2335 g Sbst.: 0,6116 g $BaSO_4$.

$C_{10}H_{16}O_4N_2S_4$. Ber. C 33,71, H 4,49, N 7,86, S 35,95.
Gef. „ 33,96, „ 4,40, „ 7,86, „ 36,02.

Die Verbindung schmilzt bei 84°. Sie ist in warmem Benzol äußerst leicht und dann stufenweise schwerer löslich in Alkohol, Äther, Ligroïn. Sie ist geruchlos. Beim Kochen mit Wasser schmilzt sie und zersetzt sich unter Verbreitung des Senfölgeruches.

Alaninäthylester.

Das schon von Curtius und Koch beschriebene Hydrochlorat ist so leicht löslich, daß man auf seine Isolierung am besten verzichtet. Es wird deshalb die salzsaure alkoholische Lösung unter stark vermindertem Druck aus einem Bade, welches nicht heißer als 35° ist, bis zum Sirup eingedampft. Den Rückstand behandelt man in ähnlicher Weise wie das Hydrochlorat des Glykocollesters.

Der Alaninester siedet unter 11 mm Druck bei 48⁰ und hat die Dichte $D_{12,5^0} = 0,9846$. Die Ausbeute betrug 80% der Theorie, berechnet auf das angewandte Alanin.

0,1905 g Sbst.: 0,3575 g CO_2, 0,1610 g H_2O. — 0,2149 g Sbst.: 21,6 ccm N (13⁰, 764 mm).

$C_5H_{11}NO_2$. Ber. C 51,28, H 9,40, N 11,97.
Gef. „ 51,13, „ 9,39, „ 11,94.

In Geruch und Reaktionen gleicht die Verbindung dem Glykocollester, unterscheidet sich aber von diesem durch größere Haltbarkeit. Erst nach wochenlangem Stehen des Präparates bei gewöhnlicher Temperatur gab sich eine Veränderung durch Abscheidung von feinen Nädelchen zu erkennen, welche den Schmelzpunkt des längst bekannten Lactimids zeigten.

Viel rascher entsteht die gleiche Substanz beim 24-stündigen Erhitzen im geschlossenen Rohr auf 180⁰. Die Ausbeute betrug dann die Hälfte des angewandten Esters oder 82% der Theorie, und das Produkt bestand aus fast farblosen, langen Prismen, welche gleich den richtigen Schmelzpunkt 274⁰ (280⁰ korr.) zeigten.

Das Verfahren ist zur Darstellung des Körpers der älteren Methode, von welcher Preu selbst angibt, daß sie schlechte Ausbeuten liefere, jedenfalls vorzuziehen.

Die Bildung eines Produktes mit Biuretreaktion, welche beim Glykocoll so leicht erfolgt, habe ich bei der spontanen Zersetzung des Alaninesters oder der höheren Homologen bisher nicht beobachtet.

Beim mehrstündigen Kochen mit der 10-fachen Menge Wasser am Rückflußkühler wird der Alaninester vollständig verseift, was man an dem Verschwinden der alkalischen Reaktion verfolgen kann, und beim Abdampfen der Lösung bleibt das Alanin in quantitativer Ausbeute zurück.

Das Pikrat des Alaninäthylesters ist in warmem Wasser ziemlich leicht löslich, kristallisiert daraus in feinen gelben Nadeln und schmilzt bei 168⁰ (171⁰ korr.).

Diese Versuche wurden mit dem racemischen Alanin angestellt, infolgedessen ist der Ester auch als ein Gemisch von *d*- und *l*-Form zu betrachten. Es ist indessen nicht zu bezweifeln, daß die Ester der beiden aktiven Alanine ebenso zu gewinnen sind und den gleichen Siedepunkt besitzen.

α-Aminobuttersäureäthylester.

10 g racemische α-Aminobuttersäure wurden fein zerrieben, in 50 ccm absolutem Alkohol suspendiert und gasförmige Salzsäure ohne Abkühlung eingeleitet. Nachdem die Aminosäure im Laufe von etwa 15 Mi-

nuten in Lösung gegangen, wurde noch etwa 10 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt und dann die Lösung in einer Kältemischung gekühlt. Dabei fiel das Hydrochlorat des Esters als dicker Brei von feinen Nadeln aus, welche abgesaugt und mit kaltem Alkohol und Äther gewaschen wurden. Die Ausbeute betrug 12 g oder 74% der Theorie. Aus der Mutterlauge kann noch durch Eindampfen unter stark vermindertem Druck eine weitere Menge gewonnen werden. Das Salz löst sich in der gleichen Quantität Wasser beim gelinden Erwärmen auf, fällt aber beim Abkühlen wieder in farblosen feinen Nädelchen aus, ebenso kristallisiert es aus heißem Alkohol. Zur Abscheidung des freien Esters verfährt man ähnlich wie beim Glykocoll. Die Operation wird aber durch die geringere Löslichkeit des Produktes erleichtert. Der Ester siedet unter 11 mm Druck bei 61,5° und hat $D_{12,5^0} = 0,9655$.

Er ist in Wasser noch sehr leicht löslich, wird aber schon durch wenig Kaliumcarbonat ausgesalzen. Mit den anderen üblichen Lösungsmitteln ist er in jedem Verhältnis mischbar.

0,2043 g Sbst.: 0,4120 g CO_2, 0,1852 g H_2O. — 0,1913 g Sbst.: 17,5 ccm N (14°, 753 mm).

$C_6H_{13}O_2N$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,69.
Gef. „ 55,00, „ 10,06, „ 10,60.

Der Geruch ist nicht so stark alkalisch wie derjenige des Glykocollesters. Das Pikrat kristallisiert aus Wasser in kleinen dünnen Prismen, die bei 126° (127° korr.) schmelzen.

Ebenso leicht wie der α-Aminobuttersäureester läßt sich die β-Verbindung darstellen, welche nach den Versuchen des Herrn Roeder, die später mitgeteilt werden sollen, unter 12,5 mm Druck bei 59—60° siedet. Dagegen mißlang der Versuch bei der γ-Aminobuttersäure, von der mir Herr J. Tafel eine größere Quantität, welche er durch sein schönes Verfahren aus Succinimid gewonnen hatte, zur Verfügung stellte.

Die Veresterung verläuft auch hier, wie schon Tafel beobachtet hat[1]) normal, wenn man die Säure in der 5-fachen Menge Alkohol suspendiert und Salzsäure einleitet. Sie geht rasch in Lösung, und wenn man nachher noch kurze Zeit auf dem Wasserbade erwärmt, so scheidet die Flüssigkeit beim starken Abkühlen einen dicken Brei von feinen Kristallen ab, welche das Hydrochlorat des Esters sind. Als die ganze Masse aber durch Eindampfen im Vakuum, Zerlegen mit Alkali, Ausziehen mit Äther und Destillation im Vakuum auf freien Ester verarbeitet wurde, resultierte ausschließlich das innere Anhydrid der γ-Aminobuttersäure, das Pyrrolidon, für welches unter 12 mm Druck der Siedepunkt 133° beobachtet wurde.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2232 [1900].

3,6-Diäthyl-2,5-Diacipiperazin, $C_4H_4O_2N_2(C_2H_5)_2$.

Das bisher nicht bekannte Produkt hatte sich nach 24-stündigem Erhitzen des α-Aminobuttersäureesters auf 170° in glänzenden, schwach gelb gefärbten Blättchen ausgeschieden, welche beim Waschen mit Äther farblos wurden. Die Ausbeute betrug 83% der Theorie. Zur völligen Reinigung genügt einmaliges Umkristallisieren aus heißem Alkohol, von welchem ungefähr die 30-fache Gewichtsmenge nötig ist. Die Verbindung scheidet sich daraus in glänzenden Blättchen ab, welche unter dem Mikroskop wie Rhomben aussehen, bei 265° (korr.) schmelzen und schon 2° niedriger wieder erstarren.

0,2021 g Sbst.: 0,4185 g CO_2, 0,1484 g H_2O. — 0,2033 g Sbst.: 28,2 ccm N (15°, 762 mm).

$C_8H_{14}O_2N_2$. Ber. C 56,46, H 8,23, N 16,47.
Gef. „ 56,48, „ 8,16, „ 16,28.

Die Verbindung löst sich in starker Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) sehr leicht, in verdünnter Säure aber viel schwerer. In heißem Wasser ist sie schon recht schwer löslich.

Leucinäthylester.

Wie schon erwähnt, hat Röhmann das Hydrochlorat des Esters dargestellt, und zwar sowohl die aktive wie die inaktive Form. Für die Darstellung der freien Ester ist die Isolierung der recht leicht löslichen Hydrochlorate überflüssig. Zur Bereitung des inaktiven Produktes geht man am bequemsten von dem synthetischen Leucin aus.

20 g desselben werden mit 100 ccm Alkohol übergossen und durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure in Lösung gebracht. Zum Schluß wird noch 15 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt und dann die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck aus einem Bade, dessen Temperatur nicht über 35° steigt, zum Sirup verdampft. Den Rückstand löst man in möglichst wenig Wasser, überschichtet mit Äther, kühlt auf 0° ab und fügt dann allmählich einen Überschuß von konzentrierter Natronlauge zu. Die ätherische Lösung des Leucinesters wird getrocknet und nach dem Verdampfen des Äthers im Vakuum destilliert. Für die Analyse diente ein Produkt, welches mit Calciumoxyd getrocknet war.

0,1772 g Sbst.: 0,3912 g CO_2, 0,1723 g H_2O. — 0,2318 g Sbst.: 17,4 ccm N (16°, 769 mm).

$C_8H_{17}O_2N$. Ber. C 60,38, H 10,70, N 8,80.
Gef. „ 60,21, „ 10,80, „ 8,85.

Die Ausbeute an reinem Ester betrug 75—80% der Theorie. Der Siedepunkt lag unter 12 mm Druck bei 83,5°, unter 18 mm bei 88° und unter 761 mm bei 196°. Spez. Gewicht $D_{17^0} = 0,929$.

Der Ester hat einen eigentümlichen, nicht sehr starken, aber unangenehmen Geruch. Er löst sich in etwa 23 Teilen Wasser von Zimmertemperatur; durch konzentriertes Alkali oder durch Salze, wie Kaliumcarbonat, wird er leicht daraus abgeschieden. In verdünnten Mineralsäuren ist er sehr leicht löslich, mit Alkohol, Äther, Benzol und Ligroïn in jedem Verhältnis mischbar. Das Pikrat ist selbst in heißem Wasser ziemlich schwer löslich und kristallisiert in gelben, oft garbenförmig gruppierten Nädelchen vom Schmelzpunkt 134° (136° korr.). Recht schön kristallisiert auch das neutrale *d*-weinsaure Salz aus wenig Wasser oder heißem Alkohol. Es bildet glänzende Blättchen, schmilzt bei 143° (145° korr.) und scheint nicht oder nur selten schwer in die Salze des *l*- und *d*-Leucinesters geschieden zu werden.

Zur Rückverwandlung in Leucin wird der Ester mit der 20-fachen Menge Wasser mehrere Stunden am Rückflußkühler gekocht, bis klare Lösung entstanden und die alkalische Reaktion verschwunden ist. Beim Eindampfen scheidet sich das Leucin kristallinisch aus, und die Ausbeute ist quantitativ. Man kann die Verseifung auch durch Lösen des Esters in überschüssiger Salzsäure und Eindampfen, bis eine Probe mit Alkali keinen Ester mehr abscheidet, bewerkstelligen, erhält dann aber natürlich salzsaures Leucin.

l-Leucinäthylester. Er wird auf die gleiche Weise aus dem natürlichen Leucin dargestellt. Der Siedepunkt ist, wie es nach den Erfahrungen bei den Weinsäureestern zu erwarten war, derselbe wie bei dem inaktiven Produkt.

Für die Bestimmung des Drehungsvermögens wurde der reine Ester im 1-Dezimeterrohr geprüft und $[\alpha]_D^{20^0} = +13,1^0$ gefunden.

Bei der Verseifung gab dieser Ester ein Leucin, welches, in 20-prozentiger Salzsäure gelöst, bei der Konzentration 4,48% $[\alpha]_D^{20^0} = +17,86^0$ gab, ein Wert, der mit der von E. Schulze für reines Leucin angegebenen Zahl, +17,5°, hinreichend übereinstimmt. Es geht daraus hervor, daß bei der Veresterung keine Racemisierung stattfindet.

Das Pikrat des aktiven Leucinesters scheidet sich aus Wasser in wirr durcheinander gewachsenen Nädelchen ab, deren Schmelzpunkt bei 128° (129,5° korr.) gefunden wurde

Darstellung von reinem Leucin mittels des Esters.

Wer sich jemals damit beschäftigt hat, Leucin nach den älteren Vorschriften aus Horn oder Nackenband darzustellen, der kennt die außerordentlichen Schwierigkeiten der Reinigung. Durch häufiges Um-

kristallisieren erhält man zwar schließlich recht schön aussehende Präparate, welche sich aber bei der optischen Bestimmung immer noch als unrein erweisen. Es ist mir auf diesem Wege überhaupt nicht gelungen, Produkte zu gewinnen, welche das von J. Mauthner[1]) und E. Schulze[2]) für reines Leucin angegebene Drehungsvermögen zeigten. Ich glaube deshalb, daß in früheren Zeiten sehr wenig Chemiker oder Physiologen ganz reines, aktives Leucin unter den Händen gehabt haben, und dadurch erklären sich auch die vielfachen Widersprüche über die Löslichkeit des Leucins oder über die Schmelzpunkte seiner Derivate. Im Conglutin und Caseïn hat man allerdings später Materialien gefunden, aus denen mit geringerer Mühe reines Leucin zu solieren ist, und, seitdem das Caseïn käuflich ist, pflegt man dieses für die Darstellung der Aminosäure zu benutzen. Aber auch hier bedarf es oft wiederholter Kristallisation, die große Verluste verursacht, um ein Präparat von richtigem Drehungsvermögen darzustellen.

Alle diese Schwierigkeiten werden durch die Estermethode gründlich beseitigt, weil die Verunreinigungen der Rohleucine entweder bei der Abscheidung oder bei der fraktionierten Destillation des Esters fortfallen, und man erreicht in mehreren Stunden dasselbe, wozu sonst wochenlanges Kristallisieren erforderlich ist.

So wurde der oben beschriebene, aktive Leucinester, welcher bei der Verseifung ein Leucin vom richtigen Drehungsvermögen lieferte, aus einem Rohleucin gewonnen, welches aus Caseïn hergestellt und absichtlich aus den späteren Mutterlaugen nur durch einmalige Kristallisation abgeschieden war.

Selbst aus Horn gelingt es mit dieser Methode leicht, ein fast reines Leucin darzustellen. Da der Versuch gleichzeitig den Beweis liefert, daß das Verfahren zur Aufsuchung neuer Aminosäuren geeignet ist, will ich ihn ausführlich beschreiben.

1 kg Hornspäne, nach der Vorschrift von Schwanert mit Schwefelsäure zersetzt, gaben an Rohleucin 75 g erste und 40 g zweite Kristallisation. Die erste Fraktion wurde in der für das reine Leucin beschriebenen Weise verestert und das nach dem Verdampfen der ätherischen Lösung zurückbleibende dunkle Öl bei 11 mm Druck destilliert.

Nach einem sehr geringen Vorlauf (etwa 1 g) wurden folgende Fraktionen erhalten:

83—85°	29 g,
85—95°	4,5 ,,

Als Rückstand blieb eine dunkle zähe Masse in nicht sehr großer Menge, welche bei höherer Temperatur schon deutliche Zersetzung er-

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. 7, 222 [1883].
[2]) Zeitschr. für physiol. Chem. 9, 100 [1884].

fuhr. Die Hauptfraktion gab bei abermaliger Destillation 22 g konstant siedenden Esters, der die Drehung $[\alpha]_D^{20^\circ}$ +12,84⁰ zeigte. Durch Verseifen mit Wasser wurde daraus ein Leucin erhalten, welches sehr schön aussah, bei der Elementaranalyse stimmende Zahlen gab, aber trotzdem noch nicht ganz rein war. da es in salzsaurer Lösung die spezifische Drehung +18,5⁰ zeigte (statt 17,8⁰).

Aus der zweiten Fraktion des Rohleucins wurden nur 6,5 g Leucinester isoliert. Die Gesamtausbeute betrug also etwa 35 g. Bei Berücksichtigung der Verluste, welche bei der Veresterung der reinen Aminosäure entstehen, würde aus diesen Zahlen folgen, daß in den 120 g Rohleucin nur etwa 40 g der reinen Substanz enthalten sind. Die eben erwähnte, höher siedende Fraktion der Ester zeigte ein erheblich höheres Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{20^\circ}$ +17,6⁰ und enthielt neben Leucin eine andere Aminosäure, welche leider bisher nicht ganz rein erhalten werden konnte. Die Analyse der aus dem Ester regenerierten und mehrmals kristallisierten Verbindung deutet am meisten auf Aminovaleriansäure hin, deren Vorkommen im Horn bisher nicht nachgewiesen wurde.

Der bei der Fraktionierung der Ester erhaltene Vorlauf schied beim längeren Stehen eine feste weiße Masse ab, welche starke Biuretreaktion zeigte. Da diese Verwandlung für den Glykocollester charakteristisch ist, so glaube ich schließen zu dürfen, daß bei der Hydrolyse des Horns auch Glykocoll in kleiner Menge entsteht.

Nach demselben Verfahren habe ich die Spaltungsprodukte des Caseïns und gemeinschaftlich mit Dr. Skita diejenigen des Fibroïns aus Seide untersucht. Bei ersterem wurden, außer den früher beobachteten Monoaminosäuren, gefunden Phenylalanin, α-Pyrrolidincarbonsäure und noch verschiedene andere Aminosäuren, deren Zusammensetzung erst festgestellt werden muß. Aus dem Fibroïn wurde ebenfalls Phenylalanin und außerdem eine neue Säure, deren Ester bei 10 mm Druck zwischen 130—140⁰ siedet, erhalten. Ausführlichere Mitteilungen darüber werden in der Zeitschrift für physiologische Chemie folgen. Ich habe auch Glutin und Blutfibrin in Arbeit genommen und beabsichtige, die Versuche auf eine größere Zahl von Proteïnstoffen auszudehnen.

Darstellung
des Leucinimids (3,6-Diisobutyl-2,5-diacipiperazin).

Wie schon erwähnt, wird dasselbe am besten durch Erhitzen des Esters gewonnen, und zwar nimmt man dafür am bequemsten den synthetischen inaktiven Ester. Wird derselbe 24 Stunden im geschlossenen Rohr auf 180—190⁰ erhitzt, so besteht der Rohrinhalt nach dem Erkalten aus schwach gelb gefärbten Kristallen, welche durch Waschen

mit Äther farblos werden. Die Ausbeute betrug 63% der Theorie, und aus der ätherischen Lösung konnten auch noch 12% unveränderter Leucinester zurückgewonnen werden. Einmaliges Umkristallisieren aus siedendem Alkohol genügt zur völligen Reinigung.

0,1945 g Sbst.: 0,4537 g CO_2, 0,1700 g H_2O. — 0,2055 g Sbst.: 22,4 ccm N (20,5°, 754 mm).

$C_{12}H_{22}O_2N_2$. Ber. C 63,71, H 9,73, N 12,39.
Gef. „ 63,62, „ 9,71, „ 12,34.

Die reine Substanz schmilzt bei 271° (korr.). Dieselbe Verbindung entsteht unter gleichen Bedingungen aus dem aktiven Leucinester, wobei offenbar Racemisierung stattfindet.

Sehr langsam erfolgt die Bildung des Piperazinderivates auch schon bei niederer Temperatur. Bei einem Präparat, welches bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt wurde, hatten sich nach mehreren Monaten feine Nadeln in kleiner Menge abgeschieden, welche leicht durch den Schmelzpunkt identifiziert werden konnten.

Rasch verläuft die gleiche Reaktion in alkoholischer Lösung bei Gegenwart von Natriumäthylat.

Erhitzt man 1 Teil Ester mit einer Lösung von 0,15 Teilen Natrium in 2 Teilen Alkohol 20 Minuten auf dem Wasserbade, so entsteht eine gelbe Flüssigkeit mit grünlicher Fluoreszenz, aus welcher durch Wasser das rohe Leucinimid gefällt wird; seine Menge beträgt ungefähr die Hälfte des angewandten Esters, verringert sich aber auf ungefähr $^1/_4$ beim Umkristallisieren aus Alkohol. Für die Darstellung des Piperazinderivates ist daher dieses Verfahren nicht zu empfehlen.

Aktives Benzolsulfoleucin.

Nachdem ich kürzlich die inaktive Verbindung mit dem Schmelzpunkt 146° beschrieben hatte[1]), sah ich, daß Hedin[2]) schon vor längerer Zeit ein Benzolsulfoleucin mit dem Schmp. 86° erhalten hat. Da Hedin aller Wahrscheinlichkeit nach ein natürliches, mithin aktives Leucin verwandte, so konnte der große Unterschied in den Schmelzpunkten dadurch bedingt sein. Immerhin schien eine Wiederholung des Versuches wünschenswert. Ich habe dafür ein reines Leucin mit dem richtigen Drehungsvermögen, welches aus Caseïn dargestellt war, benutzt und im übrigen die bei der inaktiven Substanz angegebenen Bedingungen innegehalten, nur wurde die Menge des Benzolsulfochlorids unbeschadet der Ausbeute auf die $1^1/_2$fache Menge des Leucins beschränkt. Zur Analyse war das Präparat aus Benzol umkristallisiert.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2370 [1900]. (*S. 128.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **23**, 3197 [1890].

0,2044 g Sbst.: 0,3961 g CO_2, 0,1186 g H_2O.

$C_{12}H_{17}NO_4S$. Ber. C 53,13, H 6,27.
Gef. „ 52,86, „ 6,44.

Die Substanz läßt sich auch aus heißem Wasser kristallisieren und bildet dann feine, häufig zu Büscheln gruppierte Nadeln, welche bei 119—120° (korr.) schmelzen. Aus Benzol kristallisiert sie in flachen, abgestumpften Prismen. Für die optische Bestimmung diente die alkalische Lösung, welche nebst 4 ccm Normal-Kalilauge 1,085 g Substanz in 10,9138 g Flüssigkeit, mithin 9,94% enthielt und das spez. Gewicht 1,038 hatte. Drehung im 2-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht 8,05° nach links, also $[\alpha]_D^{20°} - 39,0°$. Der niedrigere Schmelzpunkt der aktiven Form beweist, daß die inaktive ein wahrer Racemkörper ist. Was endlich die große Abweichung von den Angaben Hedins betrifft, so vermute ich, daß der von ihm gefundene niedrige Schmelzpunkt durch die Unreinheit seines Leucins, für dessen Prüfung man erst in neuerer Zeit entscheidende Methoden anwendet, verursacht war.

Inaktives Acetylleucin.

Vermischt man den Ester mit der 3-fachen Menge Essigsäureanhydrid, so tritt Erwärmung ein. Zur Vollendung der Reaktion wurde noch eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt und dann das Gemisch zur Entfernung des Essigsäureanhydrids mehrmals mit Alkohol auf dem Wasserbade verdampft. Dabei blieb ein Öl, welches offenbar der Acetylleucinester ist. Dasselbe wurde mit verdünnter Natronlauge bis zur Lösung erwärmt und mit Schwefelsäure schwach übersättigt. Beim Abkühlen schied sich das Acetylleucin kristallinisch ab. Die Ausbeute betrug ungefähr $^2/_3$ des angewandten Leucinesters. Zur Analyse wurde es aus der 5-fachen Menge heißem Wasser umkristallisiert, woraus es sich in feinen, farblosen Nadeln abschied, und über Schwefelsäure getrocknet.

0,2031 g Sbst.: 0,4126 g CO_2, 0,1591 g H_2O. — 0,2227 g Sbst.: 16,0 ccm N (17°, 764 mm).

$C_8H_{15}O_3N$. Ber. C 55,50, H 8,67, N 8,09.
Gef. „ 55,40, „ 8,70, „ 8,38.

Die Substanz, welche der Acetursäure entspricht, schmilzt bei 161° (korr.). Sie löst sich leicht in Alkohol, aber recht schwer in Äther. Die Alkalisalze sind in Wasser leicht löslich.

Äthylester der inaktiven α-Aminonormalcapronsäure.

Die Verbindung wird genau so dargestellt, wie der Leucinester. Ihr Siedepunkt ist etwas höher, 90—91° unter 11 mm Druck. $D_{17°} = 0,9335$.

0,1754 g Sbst.: 0,3872 g CO_2, 0,1692 g H_2O. — 0,1949 g Sbst.: 15,1 ccm N (17°, 751 mm).

$C_8H_{17}NO_2$. Ber. C 60,38, H 10,69, N 8,80.
Gef. „ 60,21, „ 10,72, „ 8,88.

Der Geruch ist weniger unangenehm als der des Leucinesters. Die Löslichkeit in Wasser ist aber dieselbe wie dort. Durch Kaliumcarbonat wird der Ester aus der wässerigen Lösung leicht ausgesalzen.

Das Pikrat des Esters wurde aus warmem Wasser in Prismen erhalten, welche den Schmp. 123° (124° korr.) zeigten.

3,6-Dibutyl-2,5-Diacipiperazin.

Die Darstellung ist die gleiche, wie beim Leucinderivat. Die Substanz verlangt ungefähr 80 Teile siedenden Alkohols zur Lösung und kristallisiert daraus in farblosen Blättchen, welche bei 268° (korr.) schmelzen.

0,2035 g Sbst.: 0,4736 g CO_2, 0,1743 g H_2O. — 0,2237 Sbst.: 24,1 ccm N (16°, 760 mm).

$C_{12}H_{22}O_2N_2$. Ber. C 63,71, H 9,73, N 12,39.
Gef. „ 63,47, „ 9,52, „ 12,56.

Inaktiver Phenylalaninäthylester.

Als Ausgangsmaterial diente das Hydrochlorat des synthetischen Phenyl-α-Alanins. Der wie gewöhnlich isolierte Ester kochte unter 10 mm Druck bei 143°. $D_{15^0} = 1,065$.

0,2241 g Sbst.: 0,5600 g CO_2, 0,1561 g H_2O. — 0,2104 g Sbst.: 12,8 ccm N (18°, 754 mm).

$C_{11}H_{15}O_2N$. Ber. C 68,39, H 7,77, N 7,25.
Gef. „ 68,15, „ 7,74, „ 6,97.

Das dickflüssige Öl hat nur sehr schwachen Geruch. In Wasser ist es schwer löslich. Sein Pikrat ist schwerer löslich als die Verbindungen der früher beschriebenen Ester. Es kristallisiert in flachen Prismen, welche bei 154° (156,5° korr.) schmelzen.

Zur Umwandlung in das Piperazinderivat wird der Ester 24 Stunden im geschlossenen Rohr auf 180° erhitzt. Die Ausbeute betrug 75% der Theorie. Das Produkt war so rein, daß einmaliges Umkristallisieren aus Alkohol oder Eisessig genügte. Der Schmp. 300° (korr.) sowie die sonstigen Eigenschaften stimmen mit der Beschreibung überein, welche Erlenmeyer und Lipp für das Phenyllactimid gegeben haben.

l-Tyrosinäthylester.

Lilienfeld, der die Verbindung nach Curtius zuerst wieder erwähnt, gibt zwar den Schmp. 108—109° und die äußere Form der Kristalle an, macht aber keine Mitteilung über Analyse und sonstige Eigenschaften. Dasselbe gilt für eine Bemerkung von Röhmann[1]), welcher nur den Schmelzpunkt des salzsauren Esters notiert.

Zur Darstellung des Esters werden 5 g Tyrosin mit 35 ccm Alkohol übergossen und gasförmige Salzsäure in raschem Strom eingeleitet, bis Lösung erfolgt ist. Die Ausbeute wird besser, wenn man jetzt noch das doppelte Volumen Alkohol zufügt, mehrere Stunden am Rückflußkühler kocht und dann den Alkohol unter schwachem Druck abdestilliert. Zur Abscheidung des Esters wird der Rückstand mit Wasser verdünnt, die Lösung mit überschüssigem Kaliumcarbonat versetzt und mit Essigester ausgeschüttelt. Beim Verdunsten der Lösung kristallisiert der Tyrosinester, wobei die erste Fraktion nahezu farblos, die späteren aber bräunlich gefärbt sind. Die Ausbeute betrug ungefähr 85% der Theorie. Zur völligen Reinigung wird derselbe aus Essigester unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert.

0,2014 g Sbst.: 0,4655 g CO_2, 0,1284 g H_2O. — 0,2202 g Sbst.: 13,0 ccm N (19°, 756,5 mm).

$C_{11}H_{15}O_3N$.	Ber. C 63,16,	H 7,18,	N 6,70.
	Gef. „ 63,04,	„ 7,08,	„ 6,75.

Der Ester bildet farblose flache Prismen vom Schmp. 108—109° (korr.), was mit der Angabe von Lilienfeld übereinstimmt. Er ist in kaltem Wasser sehr schwer, in heißem etwas leichter löslich, auch in Äther schwer, dagegen sehr leicht in Alkohol löslich. Von kochendem Benzol und Essigester verlangt er ungefähr die 3-fache Menge zur Lösung. Als Phenol wird er wohl von Alkali, aber nicht von Alkalicarbonat gelöst.

Für die Bestimmung der spezifischen Drehung diente eine Lösung in absolutem Alkohol von 4,85% Gehalt. Dieselbe drehte im 2-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht 1,59° nach rechts und hatte das spezifische Gewicht 0,805. Mithin $[\alpha]_D^{20^\circ} + 20,4^\circ$.

Wird der Ester 24 Stunden auf 180° erhitzt, so verwandelt er sich ebenfalls in das Piperazinderivat. Dasselbe bildet zunächst eine gelbe feste Masse, welche in kaltem verdünnten Alkali gelöst und mit Säuren gefällt wird. Die Ausbeute betrug 85% der Theorie. Das Produkt ist in allen gewöhnlichen Lösungsmitteln sehr schwer löslich.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **30**, 1979 [1897].

Sarkosinäthylester.

Daß auch bei den sekundären Aminosäuren die Veresterung leicht erfolgt, beweist das Verhalten des Sarkosins.

Suspendiert man 5 g gepulvertes Sarkosin in 25 ccm Alkohol und leitet, ohne zu kühlen, einen starken Strom von Salzsäure bis zur Sättigung ein, so findet allmählich Lösung statt. Zum Schluß wird noch 1—2 Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck zum Sirup verdampft und der Rückstand, wie in früheren Fällen, mit Alkali und Kaliumcarbonat bei niederer Temperatur auf freien Ester verarbeitet. Derselbe kochte unter 10 mm Druck bei 43°, und die Ausbeute an reinem Produkt betrug 52% der Theorie. $D_{15,5^0} = 0,971$.

0,1811 g Sbst.: 0,3381 g CO_2, 0,1524 g H_2O. — 0,2156 g Sbst.: 23 ccm N (17,5°, 759 mm).

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28, H 9,40, N 11,97.
Gef. „ 50,92, „ 9,34, „ 12,33.

Die Verbindung ist in Geruch, Löslichkeit und Siedepunkt dem Glykocollester zum Verwechseln ähnlich.

Das Pikrat des Sarkosinesters schied sich aus Wasser in hübschen zentimeterlangen Nadeln ab, deren Schmelzpunkt bei 147° (149,5° korr.) lag.

Aktiver Asparaginsäurediäthylester.

Das salzsaure Salz des Esters ist schon von Curtius und Koch[1]) dargestellt worden. Ferner haben Körner und Menozzi[2]) durch Erhitzen von Fumarsäure- oder Maleïnsäureester mit Ammoniak ein unter vermindertem Druck destillierendes Öl erhalten, welches sie, allerdings ohne Angabe einer Analyse, für den neutralen Asparaginsäureester erklären. Unzweifelhaft ist aber ihr Produkt optisch-inaktiv gewesen.

Zur Darstellung des aktiven Esters wurden 10 g Asparaginsäure, welche aus dem käuflichen Präparat durch Umkristallisieren gewonnen war, in 50 ccm absolutem Alkohol suspendiert, bis zur Lösung gasförmige Salzsäure eingeleitet, dann die Flüssigkeit eine Stunde am Rückflußkühler gekocht und schließlich unter stark vermindertem Druck bei möglichst niederer Temperatur eingedampft, wobei das Chlorhydrat in seideglänzenden Nadeln sich abscheidet. Den Rückstand löst man in wenig Wasser, isoliert daraus den Ester bei möglichst niederer Temperatur mit Kaliumcarbonat und Äther und trocknet mit Natrium-

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **18**, 1294 [1885].
[2]) Gaz. chimica Ital. **17**, 226.

sulfat. Der Siedepunkt lag unter 11 mm Druck bei 126,5^0 und die Ausbeute betrug 62% der Theorie.

$D_{17^0} = 1,089$. Spez. Dreh. $[\alpha]_D^{20^0} = -9,46^0$.

0,2379 g Sbst.: 0,4416 g CO_2, 0,1693 g H_2O. — 0,2796 g Sbst.: 18,5 ccm N (18^0, 757 mm).

$C_8H_{15}O_4N$. Ber. C 50,79, H 7,94, N 7,41.
Gef. „ 50,63, „ 7,97, „ 7,61.

Der Ester bildet eine farblose, etwas dickliche Flüssigkeit, welche sich mit Alkohol, Äther, Benzol in jedem Verhältnis mischt und auch in Ligroïn noch leicht löslich ist. Aus der Lösung der Salze wird er schon durch Alkalikarbonat in Freiheit gesetzt.

Auch in Wasser löst er sich noch sehr leicht, wird aber schon durch wenig Kaliumcarbonat wieder ausgesalzen.

Im Gegensatz zu den Estern der einbasischen Aminosäuren wird er durch mehrstündiges Kochen mit Wasser nicht in Asparaginsäure zurückverwandelt, sondern erleidet eine etwas kompliziertere Verwandlung. In geringer Menge entsteht dabei ein angenehm riechendes Öl und als Hauptprodukt eine in Wasser sehr leicht lösliche Säure, welche beim Verdampfen zunächst als Sirup zurückbleibt, dann aber eine salbenartige Konsistenz annimmt und vielleicht ein Gemisch der beiden Estersäuren ist.

Leicht und glatt erfolgt dagegen die Rückbildung der Asparaginsäure aus dem neutralen Ester bei 1—2-stündigem Erhitzen mit überschüssigem Barytwasser auf dem Wasserbade. Wird dann der Baryt in der Hitze genau mit Schwefelsäure ausgefällt, so bleibt die Asparaginsäure beim Verdampfen des Filtrats in fast quantitativer Menge und nahezu reinem Zustande zurück. Ich führe das ausdrücklich an, weil die Estermethode auch zur Isolierung der Asparaginsäure aus komplizierten Gemischen zu verwenden ist.

Aktiver Glutaminsäurediäthylester.

Für den Versuch diente reine aktive Glutaminsäure aus Caseïn. Die Operation war die gleiche wie bei der Asparaginsäure; nur wurde etwas mehr Alkohol genommen, auf 10 g Säure 75 ccm, und nachdem die Lösung mit Salzsäure gesättigt war, wurde noch das doppelte Volumen Alkohol zugefügt und 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das Hydrochlorat des Esters scheint viel schwerer zu kristallisieren als dasjenige des Asparaginesters, denn beim Eindampfen der salzsauren, alkoholischen Lösung schieden sich keine Kristalle ab. Die Ausbeute an reinem Glutaminsäureester betrug 66% der Theorie. Siedepunkt bei 10 mm Druck 139—140^0.

$D_{17^0} = 1,0737$. $[\alpha]_D^{20^0} = +7,34^0$.

0,2184 g Sbst.: 0,4258 g CO_2, 0,1667 g H_2O. — 0,1957 g Sbst.: 11,6 ccm N (18°, 756 mm).

$C_9H_{17}O_4N$. Ber. C 53,20, H 8,37, N 6,89.
Gef. „ 53,17, „ 8,48, „ 6,81.

Die übrigen Eigenschaften sind denen des Asparaginesters sehr ähnlich; besondere Erwähnung verdient auch hier die große Löslichkeit in Wasser.

Zum Schluß sage ich Herrn Dr. O. Wolfes für die vortreffliche Hilfe, welche er mir bei diesen Versuchen leistete, besten Dank.

---

10. Emil Fischer und Peter Bergell: Über die β-Naphtalinsulfoderivate der Aminosäuren.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **35**, 3779 (1902).
(Eingegangen am 25. Oktober.)

Für die Abscheidung der leicht löslichen Aminosäuren aus Gemischen oder aus Lösungen, welche Salze und andere Fremdkörper enthalten, wurden bisher vorzugsweise die Benzoyl- und noch mehr die Phenylcyanatderivate benutzt. Bei den ersteren macht jedoch die Darstellung einige Schwierigkeiten, weil die Ausbeute zu wünschen übrig läßt und die Entfernung der Benzoësäure lästig ist. Auch die Phenylcyanatverbindungen haben in manchen Fällen, z. B. bei den Oxyaminosäuren, keine schönen Eigenschaften, und als besonderer Nachteil ist der Umstand zu betrachten, daß die analytischen Werte der Derivate verschiedener Aminosäuren zumal im Stickstoffgehalt nur geringe Schwankungen zeigen.

Wir haben deshalb ein neues, allgemeiner brauchbares Mittel für die Isolierung und Erkennung der Aminosäuren gesucht und in der Kombination mit β-Naphtalinsulfochlorid gefunden. Daß organische Sulfochloride mit Aminosäuren in alkalischer Lösung reagieren, ist längst bekannt. Die bezüglichen Versuche beschränken sich aber auf das Benzolsulfochlorid. Die Derivate des Glycins[1]), *i*-Alanins und *i*-Leucins[2]) besitzen in der Tat recht schöne Eigenschaften; sie sind ziemlich schwer löslich in kaltem Wasser, kristallisieren gut, schmelzen ziemlich konstant und können deshalb für die Erkennung jener Aminosäuren benutzt werden. Aber diese Vorteile gehen zum großen Teil verloren bei den Derivaten der Oxyaminosäuren und bei den komplizierten Verbindungen vom Typus des Glycylglycins.

Um die Löslichkeit in Wasser zu verringern, haben wir das Benzolsulfochlorid durch das β-Naphtalinsulfochlorid ersetzt und dadurch so schöne Derivate erhalten, daß man mit Hilfe derselben auch Serin,

---

[1]) Ihrfelt, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **22**, Ref. 692 [1889].

[2]) Hedin, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **23**, 3197 [1890]; E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2380 [1900]; **34**, 448 [1901]. (*S. 189.*)

Oxypyrrolidincarbonsäure oder Glycylglycin und wahrscheinlich viele ähnlich gebildete Substanzen erkennen kann. Einen besonders guten Dienst leistete uns das neue Reagens bei dem Studium der Abbauprodukte des Seidenfibroins, denn es gelang mit Hilfe desselben, dort eine Verbindung vom Typus des Glycylglycins zu isolieren.

Für die nachfolgenden Veruche diente ein β-Naphtalinsulfochlorid, welches in der üblichen Weise[1]) dargestellt, aber durch Destillation bei 0,3 mm Druck gereinigt wurde. Nach dem Umkristallisieren aus Benzol schmolz das Präparat 2° höher als in der Literatur angegeben (76°), d. h. bei 78° (korr. 79°).

Die Wechselwirkung zwischen Chlorid und Aminosäure vollzieht sich am besten unter folgenden Bedingungen. Zwei Mol.-Gew. Chlorid werden in Äther gelöst, dazu fügt man die Lösung der Aminosäure in der für ein Molekül berechneten Menge Normal-Natronlauge und schüttelt mit Hilfe einer Maschine bei gewöhnlicher Temperatur. In Intervallen von ein bis anderthalb Stunden fügt man dann noch dreimal die gleiche Menge Normal-Alkali hinzu. Der Überschuß des Chlorids ist erfahrungsgemäß für die Ausbeute vorteilhaft. Da es nicht vollständig verbraucht wird, so ist zum Schluß die wässerige Lösung noch alkalisch. Sie wird von der ätherischen Schicht getrennt, filtriert, wenn nötig nach der Klärung mit Tierkohle, und mit Salzsäure übersättigt. Dabei fällt die schwerlösliche Naphtalinsulfoverbindung aus.

β-Naphtalinsulfoglycin, $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.COOH$.

Das Rohrprodukt fällt aus der alkalischen Lösung beim Ansäuern in der Kälte sofort als kristallinischer Niederschlag aus. Geschieht die Abscheidung in der Wärme, so ist es zuerst ölig, erstarrt aber sehr bald kristallinisch. Die Ausbeute beträgt etwa 85% der Theorie. Aus heißem Wasser kristallisiert die Substanz in langgestreckten, manchmal zugespitzten Blättern, die meist büschelförmig verwachsen sind und kein Kristallwasser enthalten. Im Kapillarrohr sintert sie bei 151° und schmilzt bei 156° (korr. 159°).

Die im Vakuumexsikkator getrocknete Substanz verlor bei 120° kein Wasser.

0,1854 g Sbst.: 0,3703 g CO_2, 0,0710 g H_2O. — 0,2330 g Sbst.: 10,8 ccm N (20°, 750 mm). — 0,0788 g Sbst.: 0,0696 g $BaSO_4$.

$C_{12}H_{11}O_4NS$. Ber. C 54,34, H 4,15, N 5,28, S 12,07.
Gef. „ 54,47, „ 4,25, „ 5,23, „ 12,13.

---

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 47, 94.

Die Verbindung löst sich in 2670 Teilen Wasser von 20°. Von kochendem Wasser verlangt sie ungefähr 90 Teile.

Dagegen ist sie in absolutem Alkohol auch in der Kälte leicht löslich.

Das Kupfersalz ist selbst in heißem Wasser recht schwer löslich, in verdünntem Alkohol erheblich leichter löslich, kristallisiert in sehr feinen, glitzernden Blättchen und besitzt trocken eine blaßblaue Farbe.

Der Äthylester entsteht sehr leicht, wenn man die Lösung der Säure mit der 10-fachen Menge absolutem Alkohol ohne Kühlung mit Salzsäuregas sättigt, und scheidet sich beim Eingießen der alkoholischen Flüssigkeit in kaltes Wasser als dicker Brei von feinen Nadeln aus. Durch einmaliges Lösen des abgesaugten Produktes in Alkohol und Fällen mit Wasser erhält man ein reines Präparat, welches für die Analyse im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurde.

0,1933 g Sbst.: 0,4042 g CO_2, 0,0922 g H_2O.

$C_{14}H_{15}O_4NS$. Ber. C 57,33, H 5,12.
Gef. „ 57,03, „ 5,30.

Der Ester schmilzt bei 74° (korr.) zu einem Öl, das beim Erkalten kristallinisch erstarrt. Er löst sich nicht allein in Alkohol, sondern auch in Äther leicht. Bemerkenswert ist, daß er auch von verdünnten Alkalien leicht gelöst und durch Säuren wieder ausgefällt wird. In dieser Eigenschaft gleicht er den gewöhnlichen Benzolsulfamiden, welche bekanntlich ebenfalls schwache Säuren sind.

Ähnliche Ester liefern auch die nachfolgenden Naphtalinsulfoderivate, und da diese Produkte meit gut kristallisieren und scharfe Schmelzpunkte haben, so wird man sie in manchen Fällen, neben den freien Naphtalinsulfosäuren, zur Erkennung von Aminosäuren mit Vorteil benutzen können.

Das Naphtalinsulfoglycin wird beim 3-stündigen Erhitzen mit der 10-fachen Menge Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) auf 110° völlig gespalten, und das hierbei zurückgebildete Glykocoll läßt sich auf ziemlich einfache Weise rein gewinnen.

Racemisches β-Naphtalinsulfoalanin,

$C_{10}H_7.SO_2.NH.CH(CH_3).COOH$.

Es wird gewonnen aus dem racemischen Alanin und scheidet sich beim Ausfällen in der Kälte zunächst als farbloses Öl ab, welches bald kristallinisch erstarrt. Es kristallisiert in feinen, meist zu eigentümlichen Aggregaten verwachsenen Nadeln, welche makroskopisch den Papierfasern gleichen. Schmp. 150—151° (korr. 152—153°). Die Lös-

lichkeit in Wasser ist ähnlich wie bei der Glycinverbindung. Beim Trocknen bei 90° verliert die Substanz kein Wasser.

0,1851 g Sbst.: 0,3779 g CO_2, 0,0804 g H_2O.

$C_{13}H_{13}O_4NS$. Ber. C 55,91, H 4,66.
Gef. „ 55,68, „ 4,82.

Das Kupfersalz fällt aus heißem Wasser, in welchem es schwer löslich ist, als grünblaue mikrokristallinische Masse aus.

β-Naphtalinsulfo-*d*-alanin.

Für die Bereitung diente reines *d*-Alanin, welches aus Seidenfibroïn gewonnen war. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung fällt die Verbindung als Öl aus, welches viel schwerer kristallisiert als der zuvor beschriebene Racemkörper. In der Regel bedarf es längeren Stehens bei 0°, um das Öl zum Erstarren zu bringen. Die Kristallisation wird durch Einimpfen eines Kriställchens beschleunigt. Gereinigt wurde die Substanz durch Lösen in heißem Wasser, aus dem sie beim Abkühlen zunächst wieder ölig ausfiel. Sie kristallisiert in sehr feinen, meist büschelförmig verwachsenen Nädelchen. Ausbeute ca. 90% der Theorie.

Im Kapillarröhrchen erhitzt, sintert sie bei 62° und schmilzt bei 78—80° (79—81° korr.). Sie enthält Kristallwasser.

0,2916 g verloren, bei 85° getrocknet, 0,0150 g = 5,14% (1 Mol. ber. 6,06%).

Die kristallwasserfreie Substanz sintert von 117° ab und schmilzt bei 122—123°. Leider gab die Analyse, für welche das Präparat bei 85° getrocknet war, keine scharfen Zahlen.

0,1796 g Sbst.: 0,3597 g CO_2, 0,0773 g H_2O. — 0,2065 g Sbst.: 0,4188 g CO_2, 0,0759 g H_2O.

$C_{13}H_{13}O_4NS$. Ber. C 55,91, H 4,66.
Gef. „ 54,62, 55,31, „ 4,77, 4,08.

Wir haben uns vergeblich bemüht, die Ursache dieser Abweichung zu ermitteln.

Bessere Resultate ergab der Äthylester, welcher ebenso dargestellt wurde, wie es zuvor beim Glycylderivat beschrieben ist. Er bildet, wie dieses, lange farblose Nadeln und hat eine ähnliche Löslichkeit. Er enthält ebenso wie die freie Säure Kristallwasser und schmilzt im wasserhaltigen Zustand gegen 78°. Wird die geschmolzene Masse einige Stunden auf 90° gehalten, so entweicht alles Wasser; beim Erkalten kristallisiert sie wieder vollständig und schmilzt dann wieder scharf bei 90,5° (korr.). Das so getrocknete Präparat gab folgende Zahlen:

0,1923 g Sbst.: 0,4153 g CO_2, 0,0985 g H_2O.

$C_{15}H_{17}O_4SN$. Ber. C 58,63, H 5,54.
Gef. „ 58,89, „ 5,69.

Racemisches β-Naphtalinsulfoleucin,
$C_{10}H_7.SO_2.NH.CH(C_4H_9).COOH$.

Das aus der alkalischen Lösung beim Ansäuern ausfallende Öl kristallisiert ziemlich rasch, und beim Umlösen aus heißem verdünntem Alkohol erhält man farblose, glänzende Blättchen, welche bei 145—146° (korr.) schmelzen. Die Verbindung ist in Alkohol und Äther sehr leicht löslich, von heißem Wasser verlangt sie ungefähr 500 Teile. Sie ist kristallwasserfrei und hat die Zusammensetzung:

0,1004 g Sbst.: 0,2210 g CO_2, 0,0550 g H_2O.

$C_{16}H_{19}O_4NS$. Ber. C 59,81, H 5,92.
Gef. „ 60,03, „ 6,08.

Optisch-aktives β-Naphtalinsulfoleucin.

Zur Bereitung diente *l*-Leucin aus Horn, welches, in 20-prozentiger Salzsäure gelöst, die spez. Drehung $[\alpha]_D^{20} = +17,1^0$ zeigte. Das Rohprodukt fiel beim Ansäuern der alkalischen Lösung als farbloses Öl aus, welches erst nach zwei Tagen fest wurde. Es wurde aus der 120-fachen Menge 20-prozentigen Alkohols umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 74% der Theorie. Die Verbindung kristallisiert in langen, sehr dünnen, spießartigen Prismen. Im Kapillarrohr erhitzt, sintert sie bei 60° und ist bei 67° (korr. 68°) völlig zu einem farblosen Öl geschmolzen. In Alkohol und Äther ist sie leicht löslich, sehr schwer in Wasser. Von kochendem Wasser verlangt sie ungefähr 400 Teile.

Die Kristalle enthalten ein Mol. Wasser, welches bei 85° entweicht.

0,1190 g Sbst.: 0,0066 g H_2O.

Ber. H_2O 5,40. Gef. H_2O 5,54.

Zur Analyse diente die im Vakuumexsikkator bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete Substanz.

0,1984 g Sbst.: 0,4123 g CO_2, 0,1094 g H_2O.

$C_{16}H_{19}O_4NS + H_2O$. Ber. C 56,63, H 6,19.
Gef. „ 56,67, „ 6,12.

Racemisches β-Naphtalinsulfophenylalanin,
$C_{10}H_7.SO_2.NH.CH(COOH).CH_2.C_6H_5$.

Das aus der alkalischen Lösung beim Ansäuern ausfallende Öl kristallisiert erst nach längerem Stehen. Durch Umlösen aus heißem, sehr verdünntem Alkohol erhält man die Substanz beim Erkalten sofort

kristallinisch als weiße, asbestartige Masse, die unter dem Mikroskop als feine Nadeln erscheint. Aus Wasser kristallisiert sie in winzigen Nädelchen, die sich zu kugelförmigen Aggregaten zusammenlagern. Schmp. 141—142° (143—144° korr.). Sie löst sich in ungefähr 500 Teilen kochendem Wasser, dagegen leicht in Alkohol und Äther.

Sie ist kristallwasserfrei und wurde zur Analyse bei 90° getrocknet.

0,1807 g Sbst.: 0,4243 g CO_2, 0,0779 g H_2O.

$C_{19}H_{17}O_4SN$. Ber. C 64,23, H 4,79.
Gef. „ 64,04, „ 4,79.

Optisch-aktive β-Naphtalinsulfo-α-pyrrolidincarbonsäure,

$$C_{10}H_7.SO_2.N\begin{cases} CH_2 — CH_2 \\ \quad\quad\quad\quad | \\ CH(COOH).CH_2 \end{cases}.$$

Zur Bereitung diente aktive α-Pyrrolidincarbonsäure aus Caseïn. Beim Ansäuern fällt die Verbindung aus der alkalischen Lösung als weißes Öl aus, das schnell fest wird. Ausbeute 84% der Theorie. Sie kristallisiert aus heißem, verdünntem Alkohol wie aus Wasser in äußerst dünnen, oft zentimeterlangen Blättchen, welche ein Molekül Kristallwasser enthalten. Im Kapillarrohr sintert sie deshalb schon bei 80° und schmilzt bei 132° (korr. 133,7°); die bei 90° getrocknete Substanz schmilzt, ohne sich vorher zu verändern, bei 136° (korr. 138°).

In kaltem Wasser ist sie schwer löslich, von kochendem verlangt sie ungefähr 130 Teile. In Alkohol ist sie leicht löslich, schwerer in Äther.

0,1776 g Sbst. bei 90°: 0,0098 g H_2O.

Ber. H_2O 5,57. Gef. H_2O 5,52.

Die so getrocknete Substanz diente zur Analyse.

0,1518 g Sbst.: 0,3299 g CO_2, 0,0704 g H_2O.

$C_{15}H_{15}O_4NS$. Ber. C 59,01, H 4,91.
Gef. „ 59,26, „ 5,15.

β-Naphtalinsulfoserin, $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH(CH_2.OH).COOH$.

Das Rohprodukt wird aus der alkalischen Lösung durch Salzsäure als weiße, amorphe Masse gefällt. Löst man es wieder in sehr verdünnter Natronlauge und übersättigt mit Salzsäure, so entsteht anfangs nur eine Trübung, aber nach kurzer Zeit scheiden sich flache, verbogene und häufig miteinander zu knolligen Kristallaggregaten verwachsene Nadeln aus. Beim weiteren Umkristallisieren derselben aus Wasser erhält man je nach den Bedingungen ein kristallwasserhaltiges oder ein kristallwasserfreies Präparat. Das letztere bildet sich, wie es scheint, am leich-

testen beim raschen Abkühlen einer konzentrierten Lösung, aber wie leicht begreiflich, hat man es nicht sicher in der Hand, diese Form ausschließlich zu gewinnen. Der Wassergehalt der anderen Form scheint 3 Molekülen zu entsprechen, aber die quantitativen Bestimmungen haben auch hier keine ganz scharfen Werte ergeben. Das Wasser entweicht beim Trocknen im Vakuum bei 80°. Am bequemsten erhält man die kristallwasserfreie Verbindung aus heißem Alkohol, aus dem sie in winzigen Nädelchen kristallisiert.

0,2015 g Sbst.: 0,3913 g CO_2, 0,0829 g H_2O. — 0,3302 g Sbst.: 13,8 ccm N (20°, 761 mm).

$C_{13}H_{13}O_5NS$. Ber. C 52,88, H 4,41, N 4,74.
Gef. „ 52,96, „ 4,57, „ 4,78.

Die trockne Verbindung schmilzt bei 210 (214° korr.) zu einem farblosen Öl. Sie löst sich in ungefähr 70—80 Teilen kochenden Wassers. Von absolutem Alkohol braucht sie dagegen noch nicht den zehnten Teil, und beim Abkühlen kristallisiert sie zum größten Teil aus. In Äther ist sie ziemlich schwer löslich. Durch die geringe Löslichkeit in kaltem Alkohol unterscheidet sich diese Verbindung in vorteilhafter Weise von den entsprechenden Derivaten der gewöhnlichen Aminosäuren und läßt sich höchstwahrscheinlich von ihnen dadurch trennen. Infolge der geringen Löslichkeit in Wasser scheint sie auch für die Isolierung des Serins recht brauchbar zu sein, und wir werden versuchen, sie für den Nachweis dieser Oxyaminosäure unter den Spaltungsprodukten der Proteïne zu verwerten.

β-Naphtalinsulfooxy-α-pyrrolidincarbonsäure.

Zur Herstellung diente Oxypyrrolidincarbonsäure aus Leim[1]). In gewöhnlicher Weise dargestellt, fällt die Verbindung zunächst als Öl aus, das bald kristallinisch erstarrt und aus heißem Wasser umkristallisiert wird. Ausbeute fast quantitativ. Sie kristallisiert aus Wasser in äußerst dünnen, manchmal langgestreckten Blättchen, beim freiwilligen Verdunsten einer konzentrierten, alkoholischen Lösung in dendritisch verwachsenen, langen, dünnen Blättern. Im Kapillarrohr erhitzt, sintert sie bei 86° und schmilzt von 90—91° (korr. 91—92°) zu einem hellbraunen Öl.

Die Substanz ist schwer löslich in kaltem Wasser, von kochendem verlangt sie dagegen nur ungefähr 25 Teile. In Alkohol ist sie sehr leicht löslich, ziemlich leicht auch in Äther.

Sie enthält 1 Mol. Kristallwasser, welches bei 85° entweicht.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2660 [1902]. (*S. 680.*)

0,1826 g Sbst.: 0,0096 g H_2O.

Ber. H_2O 5,31. Gef. H_2O 5,26.

Zur Analyse diente die im Vakuumexsikkator bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete kristallwasserhaltige Substanz.

0,1031 g Sbst.: 0,2010 g CO_2, 0,0468 g H_2O.

$C_{15}H_{15}O_5NS + H_2O$. Ber. C 53,09, H 5,01.
Gef. „ 53,17, „ 5,04.

β-Naphtalinsulfogalaheptosaminsäure, $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH(COOH).(CH.OH)_4.CH_2.OH$.

Die bisher unbekannte Galaheptosaminsäure entsteht aus der Galactose durch Anlagerung von Cyanammonium und wird in der nachfolgenden Abhandlung beschrieben. Für ihre Kombination mit dem Naphtalinsulfochlorid gilt das früher Gesagte. Die alkalische Lösung wird beim Ansäuern zunächst nur trübe, scheidet aber nach kurzer Zeit Kristalle ab. Die Ausbeute betrug 50% der Theorie. Da das Rohprodukt etwas unveränderte Galaheptosaminsäure enthält, so kristallisiert man mehrmals aus heißer, sehr verdünnter Salzsäure. Das bei 100° getrocknete Präparat ergab folgende Zahlen:

0,1872 g Sbst.: 0,3391 g CO_2, 0,0860 g H_2O.

$C_{17}H_{21}O_9NS$. Ber. C 49,16, H 5,06.
Gef. „ 49,40, „ 5,10.

Die Substanz schmilzt gegen 198° (korr. 201°) unter Zersetzung. Sie kristallisiert in feinen, meist zu kugeligen Aggregaten vereinigten Nadeln. Sie ist in heißem Wasser leicht, in kaltem Wasser schwer löslich. Von Alkohol und Äther wird sie schwer aufgenommen.

β-Naphtalinsulfoglycylglycin, $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$.

Zur Darstellung diente salzsaures Glycylglycin, dessen Säure zunächst durch die genaue Menge Alkali neutralisiert wurde. Im übrigen wurde die Behandlung mit Naphtalinsulfochlorid und Alkali ebenso wie in den anderen Fällen ausgeführt. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung entstand dann zuerst eine ölige Fällung, die nach Abkühlen auf 0° bald in einen Brei von Kristallen verwandelt wurde. Die Ausbeute betrug 70% der Theorie. Das Produkt wird entweder aus heißem Wasser oder aus Alkohol umkristallisiert. Die aus Wasser gewonnenen Kristalle enthalten 1 Mol. Wasser, welches bei 100° entweicht.

0,8420 g Sbst.: 0,0430 g H_2O.

Ber. H_2O 5,29. Gef. H_2O 5,11.

Die getrocknete Substanz schmilzt bei 178—180° (korr. 180—182°).

0,1933 g Sbst.: 0,3693 g CO_2, 0,0791 g H_2O. — 0,1940 g Sbst.: 14,4 ccm N (18°, 752 mm).

$C_{14}H_{14}O_5N_2S$. Ber. C 52,17, H 4,35, N 8,69.
Gef. „ 52,10, „ 4,54, „ 8,48.

Sie löst sich bei 20° in 1545 Teilen Wasser. Von kochendem Wasser verlangt sie ungefähr 45 Teile. In 10 Teilen kochendem Alkohol löst sie sich und läßt sich daraus ohne große Verluste umkristallisieren. Aus Wasser kristallisiert sie entweder in sehr feinen, mikroskopischen, dünnen Blättchen oder häufiger in kugelförmig verwachsenen Nädelchen, und aus Alkohol beim schnellen Abkühlen in kleinen Prismen oder in größeren meist zusammengelagerten und häufig sechsseitigen Blättchen, welche kein Kristallwasser enthalten. Nach längerem Stehen oder beim langsamen Erkalten einer 5—10-prozentigen, alkoholischen Lösung bilden sich ausschließlich Prismen, die oft mehrere Millimeter lang sind. Das Kupfersalz, welches beim Kochen der wässerigen Lösung mit gefälltem Kupferoxyd leicht entsteht, ist recht schwer löslich und scheidet sich beim Erkalten als hellblaue, mikrokristallinische Masse ab, welche meist aus kugelförmigen Aggregaten von äußerst kleinen, mikroskopischen Nadeln oder Prismen besteht. Das Salz enthält in der Regel Kristallwasser (scheinbar 1 Mol.), welches im Vakuum bei 80° weggeht. Der Kupfergehalt des getrockneten Salzes entsprach der Formel

$$C_{28}H_{26}O_{10}N_4S_2Cu .$$

0,1398 g Sbst.: 0,0031 g H_2O.

Ber. H_2O 2,48. Gef. H_2O 2,22.

0,1367 g Sbst.: 0,0155 g CuO.

Ber. Cu 9,01. Gef. Cu 9,07.

---

11. Emil Fischer und Wilhelm Schmitz: Synthese der α-Aminosäuren mittels der Bromfettsäuren.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **39**, 351 (1906).
(Eingegangen am 24. Januar.)

Von allen Methoden zur Bereitung der α-Aminosäuren ist sicherlich die Behandlung der α-Halogenfettsäuren mit Ammoniak die einfachste, und man wird sie überall dort anwenden, wo die Halogensäure leicht zugänglich ist.

Einen bequemen Weg für die Gewinnung der letzteren bildet nun die Bromierung der Monoalkylmalonsäuren, denn die hierbei fast quantitativ entstehenden Brommalonsäuren gehen durch Erhitzen ebenfalls ziemlich glatt in α-Bromfettsäuren über. Das Verfahren wurde zuerst für die Gewinnung der noch unbekannten α-Bromhydrozimmtsäure benutzt[1]).

Wir haben jetzt auf dem gleichen Wege die α-Bromisocapronsäure (Isobutylessigsäure), die bekanntlich durch Ammoniak in Leucin verwandelt wird, und ferner die noch unbekannte γ-Phenyl-α-brombuttersäure, nebst der dazugehörigen Aminosäure dargestellt. Unsere Erfahrungen sind auch in diesen beiden Fällen so günstig, daß wir die Methode für ähnliche Zwecke empfehlen können.

Isobutylbrommalonsäure.

Die Isobutylmalonsäure, sowie ihr Äthylester sind von Guthzeit beschrieben[2]). Da wir größere Mengen beider Verbindungen dargestellt haben, so können wir seine kurzen Angaben durch einige Daten ergänzen.

Zur Bereitung des Esters wurden 14,5 g Natrium in der 10-fachen Menge absolutem Alkohol gelöst, 100 g Malonester und 90 g Isobutylbromid (an Stelle des teuren Jodids) zugegeben, und die Mischung 4—5 Stunden am Rückflußkühler bis zur neutralen Reaktion gekocht.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3062 [1904]. (*S. 371.*)
[2]) Ann. d. Chem. **209**, 236.

Nach dem Verdünnen mit Wasser wird ausgeäthert, die ätherische Lösung mit Kaliumcarbonat getrocknet und nach dem Verdunsten des Äthers das Öl unter vermindertem Druck destilliert. Der Siedepunkt unseres Präparates lag bei 12 mm zwischen 112—114° und bei 34 mm bei 133—134° (korr.). Die Ausbeute betrug 105 g oder 77% der Theorie. Das Präparat war nicht ganz rein, denn es enthielt eine kleine Menge eines durch Alkali sehr schwer verseifbaren Produktes.

Die Verseifung des Esters gelingt nach unseren Erfahrungen am besten durch einen sehr großen Überschuß konzentrierter Kalilauge. 100 g Ester werden bei Zimmertemperatur auf Kalilauge gegossen, die aus 208 g Ätzkali (8 Mol.) und 167 g Wasser bereitet ist. Beim Umschütteln tritt Aufkochen ein und es entsteht eine gelbliche Lösung, in der nur wenig unverseiftes Produkt (sehr wahrscheinlich Diisobutylmalonester) als Öl suspendiert ist. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mit 170 g Wasser zersetzt und unter starker Kühlung mit der berechneten Menge ebenfalls gekühlter, konzentrierter Salzsäure neutralisiert. Die Isobutylmalonsäure wird dann mit viel Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung mit Natriumsulfat getrocknet und die nach dem Abdunsten des Äthers kristallisierende Säure auf Tonplatten getrocknet. Die Ausbeute betrug 80% der Theorie. Aus heißem Benzol umkristallisiert, zeigte sie den von Guthzeit augegebenen Schmelzpunkt 107° (korr. 108°).

Die Bromierung wurde genau so wie bei der Benzylmalonsäure[1]) ausgeführt und die Ausbeute war auch hier fast quantitativ. Zur Reinigung wurde die Isobutylbrommalonsäure aus heißem Benzol zweimal umkristallisiert und im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1926 g Sbst.: 0,2486 g CO_2, 0,0823 g H_2O. — 0,1001 g Sbst.: 0,0797 g AgBr.

$C_7H_{11}O_4Br$.	Ber. C 35,1,	H 4,6,	Br 33,5.
	Gef. „ 35,2,	„ 4,8,	„ 33,9.

Die Säure schmilzt nicht ganz konstant bei 139—141° (korr.) unter Zersetzung. Sie ist in Wasser, Alkohol, Äther leicht, in kaltem Benzol aber schwer löslich und in Petroläther fast unlöslich.

Verwandlung in α-Bromisocapronsäure. Beim Schmelzen gibt die Isobutylbrommalonsäure schnell Kohlensäure ab und die Reaktion verläuft am glattesten, wenn man durch stark verminderten Druck dafür sorgt, daß die α-Bromisocapronsäure gleichzeitig destilliert. Wir haben deshalb die sorgfältig getrocknete Brommalonsäure in einem Fraktionierkolben bei 12 mm Druck bis zum Schmelzen erhitzt, wobei

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3063 [1904]. (*S. 370.*)

mit der Entwicklung der Kohlensäure gleichzeitig die Destillation der α-Bromisocapronsäure stattfand. Die Ausbeute an letzterer betrug 86% der Theorie. Bei nochmaliger Rektifikation bei 9 mm Druck ging der allergrößte Teil von 126,5—128,5 (Thermometer ganz im Dampf) über, und die Analyse des Präparates gab folgende Zahlen.

0,1847 g Sbst.: 0,2516 g CO_2, 0,0960 g H_2O. — 0,1882 g Sbst.: 0,1820 g AgBr.

$C_6H_{11}O_2Br$. Ber. C 36,9, H 5,6, Br 41,0.
Gef. „ 37,2 „ 5,8, „ 41,2.,

Da seine Struktur nach der Synthese nicht zweifelhaft ist, so haben wir es benutzt, um die Struktur der früher auf anderem Wege dargestellten und zu Synthesen benutzten α-Bromisocapronsäure[1]) zu kontrollieren. Zu dem Zweck haben wir einerseits aus dem neuen Präparate mit Phosphorpentachlorid das Chlorid bereitet, dessen Siedepunkt diesmal bei 16 mm zwischen 74° und 76° lag, und andererseits die Bromsäure selbst durch Ammoniak in Leucin übergeführt, das alle Eigenschaften des racemischen Leucins zeigte.

Es scheint uns demnach zweifellos, daß die früher beschriebene Bromisocapronsäure, die aus der bei Kahlbaum käuflichen und aus Isoamylcyanid bereiteten Isocapronsäure durch Brom und Phosphor dargestellt war, bei weitem der Hauptmenge nach oder vielleicht auch ganz aus α-Bromisocapronsäure,

$$(CH_3)_2CH.CH_2.CHBr.COOH\ ,$$

bestand.

Da sie auf dem ersten Wege leichter zugänglich ist, so hat die neue Synthese aus der Isobutylmalonsäure vorläufig kein praktisches Interesse.

β-Phenyläthylmalonester, $C_6H_5.CH_2.CH_2.CH(COOC_2H_5)_2$.

Das für die Synthese des Esters erforderliche ω-Chloräthylbenzol wurde nach Fittig und Kiesow[2]) dargestellt und nach Anschütz[3]) unter vermindertem Druck fraktioniert. Wie letzterer angibt, destilliert es bei 17 mm von 90—95°, bei 10 mm fanden wir 84—87° (korr.). Die Ausbeute betrug 50% der Theorie.

Um das wertvolle Chlorid möglichst auszunutzen, haben wir für die Kupplung einen Überschuß ($1^1/_2$ Mol.) Malonester verwendet. 7,5 g

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2988 [1903]; **37**, 2492. (*S. 332.*)
[2]) Ann. d. Chem. **156**, 246.
[3]) Ann. d. Chem. **235**, 329.

Natrium wurden in der 10-fachen Menge Alkohol gelöst, 51,5 g Malonester und 30 g Chlorid zugegeben und das Gemisch 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Isolierung des neuen Esters geschah in der üblichen Weise durch Verdampfen der alkoholischen Lösung, Versetzen mit Wasser, Ausäthern, Trocknen mit Kaliumcarbonat und Fraktionieren unter geringem Druck. Der Phenyläthylmalonester ging unter 24 mm bei 185—187° über. Analysiert wurde er nicht.

β-Phenyläthylmalonsäure, $C_6H_5.CH_2.CH_2.CH(COOH)_2$.

Zur Verseifung wird der Ester mit dem gleichen Gewicht konzentrierter Kalilauge (spez. Gewicht 1,32) emulgiert und unter Zusatz von einigen Tropfen Alkohol auf dem Wasserbade erhitzt, wobei er nach kurzer Zeit in Lösung geht. Nach weiterem $^1/_4$-stündigem Erhitzen ist die Reaktion beendet. Man übersättigt dann die erkaltete Lösung unter Kühlung mit Salzsäure und extrahiert mit Äther. Beim Verdunsten bleibt die Säure kristallinisch zurück. Die Ausbeute beträgt 80—85% der Theorie, berechnet auf den Ester. Zur Reinigung wird die Säure aus heißem Toluol rasch umkristallisiert; sie bildet dann farblose, glänzende Blättchen, welche für die Analyse im Vakuumexsikkator getrocknet wurden.

0,1900 g Sbst.: 0,4428 g CO_2, 0,1017 g H_2O.

$C_{11}H_{12}O_4$. Ber. C 63,5, H 5,80.
Gef. „ 63,6, „ 5,95.

Sie schmilzt nicht ganz konstant unter Kohlensäureentwickelung gegen 142—144° (korr.). Sie ist in warmem Wasser, Alkohol und Äther sehr leicht löslich. Aus der konzentrierten, heißen, wässerigen Lösung kristallisiert sie beim Erkalten ziemlich rasch in sehr feinen vier- oder sechsseitigen Blättchen aus. Aus heißem Toluol scheiden sich ähnliche glänzende Blättchen ab.

β-Phenyläthylbrommalonsäure, $C_6H_5.CH_2.CH_2.CBr.(COOH)_2$.

Die Bromierung der vorhergehenden Säure wurde genau so ausgeführt, wie diejenige der Benzylmalonsäure, und die Bromverbindung aus heißem Toluol umkristallisiert. Für die Analyse war bei 60° getrocknet.

0,1677 g Sbst.: 0,2852 g CO_2, 0,0598 g H_2O. — 0,1683 g Sbst.: 0,1094 g AgBr.

$C_{11}H_{11}O_4Br$. Ber. C 46,0, H 3,8 Br 27,9.
Gef. „ 46,4, „ 3,95, „ 27,7.

Sie schmilzt unter Zersetzung und deshalb nicht konstant bei 116 bis 118° (korr.).

In warmem Wasser ist sie sehr leicht löslich und scheidet sich bei guter Abkühlung nur langsam in mikroskopisch kleinen Nadeln oder dünnen Prismen ab. Sie ist ebenfalls leicht löslich in Äther und Alkohol, ziemlich schwer in kaltem, viel leichter in heißem Benzol und kristallisiert hieraus in kleinen, warzenförmigen Kristallaggregaten; fast unlösich in Petroläther.

γ-Phenyl-α-brombuttersäure, $C_6H_5.CH_2.CH_2.CHBr.COOH$.

Wie zuvor erwähnt, schmilzt die gebromte Malonsäure unter Zersetzung. Sie verliert dabei Kohlensäure und verwandelt sich in die Phenylbrombuttersäure, die sich unter geringem Druck destillieren läßt. Man kann deshalb Zersetzung der Malonsäure und Destillation des Spaltungsproduktes in einer Operation unter einem Druck von 10 mm mit freier Flamme vornehmen. Es ist dabei vorteilhaft, rasch zu destillieren, um Zersetzung der Phenylbrombuttersäure möglichst zu vermeiden. Zur Reinigung wird das Destillat aus heißem Toluol umkristallisiert. Die Ausbeute an kristallinischem Produkt betrug 75% der Theorie.

Die Säure löst sich in Wasser selbst in der Siedehitze schwer und kristallisiert daraus beim Erkalten in sehr dünnen Blättchen. In Alkohol, Äther und heißem Benzol ist sie leicht löslich und kristallisiert aus letzterem beim Erkalten sehr rasch in kleinen, scheinbar rechteckigen, sehr dünnen Platten; schon in ganz verdünntem Ammoniak ist sie leicht löslich.

Die Säure schmilzt bei 188—190° (korr.) ohne Zersetzung. Für die Analyse wurde im Vakuumexsikkator getrocknet.

0,1873 g Sbst.: 0,3379 g CO_2, 0,0769 g H_2O. — 0,1738 g Sbst.: 0,1349 g AgBr.

$C_{10}H_{11}O_2Br$.	Ber.	C 49,4,	H 4,5,	Br 32,9.
	Gef.	„ 49,2,	„ 4,6,	„ 33,0.

γ-Phenyl-α-aminobuttersäure, $C_6H_5.CH_2.CH_2.CH(NH_2).COOH$.

Wird die Phenylbrombuttersäure mit der 10-fachen Menge wässerigem Ammoniak von 25% 1½ Stunden auf 100° erhitzt, so ist alles Brom abgespalten. Dasselbe erreicht man durch mehrtägiges Stehenlassen bei Bruttemperatur. Die ammoniakalische Lösung wird dann auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand zur Entfernung des Bromammons entweder mit wenig ganz kaltem Wasser behandelt

oder mit nicht zuviel Alkohol ausgekocht. Die zurückbleibende Aminosäure, deren Menge ungefähr 70% der Theorie beträgt, löst man in der 6—7-fachen Menge kochendem Wasser. Beim Abkühlen scheidet sie sich in glänzenden Nadeln oder ganz schmalen, bretterähnlichen Formen ab, die vielfach stern- oder auch büschelförmig verwachsen sind. Sie enthält 1 Mol. Kristallwasser, das im Exsikkator nicht entweicht.

0,1790 g Sbst.: 0,400 g CO_2, 0,1240 g H_2O.

$C_{10}H_{13}O_2N + H_2O$. Ber. C 60,91, H 7,61.
Gef. „ 60,94, „ 7,70.

Das Wasser entweicht bei 80° im Vakuum beim 4-stündigen Erhitzen.

0,1245 g Sbst. verloren 0,0115 g.

Ber. H_2O 9,13. Gef. H_2O 9,23.

Die Analyse der wasserfreien Substanz gab folgende Zahlen:

0,1760 g Sbst.: 0,4308 g CO_2, 0,1167 g H_2O. — 0,1599 g Sbst.: 11 ccm N (17°, 768 mm).

$C_{10}H_{13}O_2N$. Ber. C 67,04, H 7,26, N 7,82.
Gef. „ 66,75, „ 7,37, „ 8,08.

Die trockne Aminosäure färbt sich beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 247° gelb und schmilzt nicht ganz konstant gegen 252° (korr.) unter Zersetzung. Sie hat einen unangenehmen, ins Bittere gehenden Geschmack. In heißem Wasser ist sie leicht löslich. Im Gegensatz zu den meisten anderen α-Aminosäuren wird sie auch von kochendem, absolutem Alkohol in nicht unerheblicher Menge aufgenommen und scheidet sich aus der eingeengten Lösung kristallinisch ab. Das Hydrochlorat ist in kalter, starker Salzsäure ziemlich schwer löslich und kristallisiert aus warmer Salzsäure in glänzenden Blättchen. Die wässerige Lösung der Base nimmt beim Kochen reichliche Mengen von Kupferoxyd mit blauer Farbe auf. Das Kupfersalz ist in kaltem Wasser schwer löslich und kristallisiert in mikroskopisch kleinen, hellblauen Nadeln oder ganz schmalen, langen Prismen.

Kurze Zeit nach Veröffentlichung vorstehender Abhandlung haben F. Knoop und H. Hoessli (Ber. d. d. chem. Gesellsch. **39**, 1477) eine auf anderem Wege erhaltene γ-Phenyl-α-Aminobuttersänre erhalten, die von unserer Verbindung verschieden ist. Dadurch wird die oben angenommene Struktur der letzteren zweifelhaft und wir halten es auf Grund neuer Versuche, die später veröffentlicht werden, für wahrscheinlich, daß unsere Aminosäure das Phenyl in β-Stellung enthält.

---

12. Emil Fischer: Synthese der α, δ-Diaminovaleriansäure.[1])

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **34**, 454 (1901).
(Eingegangen am 12. Februar.)

Außer den längst bekannten Monaminosäuren enthalten die meisten Proteïnstoffe nach den Beobachtungen von Drechsel, E. Schulze, Hedin, Kossel auch wechselnde Mengen von Diaminosäuren, und in überwiegender Menge sind die letzteren nach den wichtigen Beobachtungen von Kossel und seinen Schülern in den Protaminen enthalten.

Genauer untersucht hat man bisher die drei Verbindungen: Ornithin, Lysin und Arginin.

Das erste wurde entdeckt von M. Jaffé[2]) als Spaltungsprodukt der Ornithursäure, welche sich in den Exkrementen der mit Benzoësäure gefütterten Hühner findet. Nach den Beobachtungen von Ellinger[3]), dem die Aufspaltung in Tetramethylendiamin und Kohlensäure durch Fäulnisbakterien gelang, ist es als eine 1,4-Diaminovaleriansäure zu betrachten, in welcher nur noch die Stellung des Carboxyls zweifelhaft bleibt.

Zu dem Arginin steht es in sehr einfachem Verhältnis, denn wie Schulze und Winterstein[4]) gefunden haben, läßt es sich durch Addition von Cyanamid in jenes überführen.

In dem Lysin besitzen wir das nächst höhere Homologe des Ornithins, eine 1,5-Diaminocapronsäure, denn es zerfällt, wie ebenfalls Ellinger[5]) gefunden hat, bei der Fäulnis in Kohlensäure und Pentamethylendiamin.

Die Aufklärung der Struktur ist also bei diesen Verbindungen so weit fortgeschritten, daß ihre Synthese ohne allzu großes Risiko in Angriff genommen werden konnte, und ich habe sie unternommen, in der

---

[1]) Der Berliner Akademie vorgelegt am 13. Dezember 1900. Vgl. Sitzungsberichte **1900**, 1111.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **10**, 1925 [1877], **11**, 406 [1878].

[3]) Zeitschr. für physiolog. Chem. **29**, 334 [1900].

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 3191 [1899], (vgl. Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 1).

[5]) a. a. O.

Hoffnung, diese wichtigen Stoffe der chemischen Bearbeitung leichter zugänglich zu machen.

Es ist mir zunächst gelungen, die α, δ-Diaminovaleriansäure zu gewinnen, welche ich für die inaktive Form des Ornithins halte.

Der Weg, der dahin führte, lehnt sich an die schönen Synthesen an, welche S. Gabriel mit Hilfe des Phtalimids ausgeführt hat. Denn als Ausgangsmaterial diente der γ-Phtalimidopropylmalonsäureester, welchen S. Gabriel[1]) aus Phtalimidkalium, Propylenbromid und Malonsäureester bereitete, und welcher ihm für die Synthese der δ-Aminovaleriansäure diente. Wie nach allen früheren Erfahrungen über die substituierten Malonsäureester zu erwarten war, nimmt die Verbindung schon bei gewöhnlicher Temperatur an dem tertiären Kohlenstoff ein Atom Brom auf und liefert den Phtalimidopropylbrommalonsäureester:

$$C_6H_4\langle{}^{CO}_{CO}\rangle N.CH_2.CH_2.CH_2.\underset{Br}{C}\langle{}^{COOC_2H_5}_{COOC_2H_5}.$$

Ich hatte gehofft, daß diese Verbindung direkt mit Ammoniak in ein Derivat der α, δ-Diaminovaleriansäure übergehe.

Der Versuch zeigte aber, daß sowohl bei Anwendung von alkoholischem, wie auch von trocknem, flüssigem Ammoniak eine komplexe Reaktion stattfindet. Das Brom wird zwar vollständig herausgespalten, und es entsteht zunächst ein Gemisch von Phtalimid und anderen Produkten, die nicht kristallisiert erhalten wurden. Als aber diese Masse zur tolalen Abspaltung der Phtalsäure und des einen Carboxyls mit starker Salzsäure auf 100° erhitzt war, da konnte von basischen Produkten im reinen Zustande nur die α-Pyrrolidincarbonsäure:

$$\begin{array}{l} CH_2.CH_2 \\ |\qquad\quad \rangle NH \\ CH_2.CH.COOH \end{array}$$

isoliert werden.

Ob in den Mutterlaugen kleinere Mengen von α, δ-Diaminovaleriansäure enthalten sind, kann ich vorläufig nicht entscheiden.

Ähnliche Erfahrungen hat Willstätter[2]) bei der Einwirkung von Ammoniak auf die α, δ-Dibromvaleriansäure, bzw. den entsprechenden Dibrompropylmalonsäureester, gemacht. Er erhielt dabei ebenfalls als Hauptprodukt die bis dahin unbekannte α-Pyrrolidincarbonsäure und mußte sich mit der Hoffnung begnügen, vielleicht aus den Nebenpro-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **23**, 1767 [1890] und **24**, 1365 [1891].
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 1160 [1900].

dukten die Diaminovaleriansäure gewinnen zu können. Ich bemerke übrigens, daß meine Versuche längst begonnen waren, bevor die Arbeit des Herrn Willstätter zu meiner Kenntnis kam.

Die unerwartete Wechselwirkung des Phtalimidopropylbrommalonsäureesters mit Ammoniak scheint bedingt zu sein durch die Neigung des tertiär gebundenen Kohlenstoffatoms, bei Abgabe des Broms eine ungesättigte Gruppe zu bilden, welche sekundär zur Entstehung des Pyrrolidinringes Veranlassung geben könnte. In der Tat läßt sich das Hindernis, welches der Einführung der zweiten Aminogruppe hier entgegensteht, leicht dadurch beseitigen, daß man zunächst den Phtalimidopropylbrommalonsäureester durch Verseifung und Abspaltung von einem Carboxyl in die entsprechende δ-Phtalimido-α-bromvaleriansäure:

$$C_6H_4\langle{}^{CO}_{CO}\rangle N.CH_2.CH_2.CH_2.\underset{Br}{CH}.COOH$$

überführt.

Denn diese verliert schon beim Erhitzen mit wässerigem Ammoniak auf 50° das Halogen, und wenn das zuerst resultierende Produkt, welches noch den Phtalsäurerest enthält, nachträglich mit starker Salzsäure gespalten wird, so entsteht in reichlicher Menge die Diaminovaleriansäure. Aus derselben ließ sich leicht das schön kristallisierende Dibenzoylderivat bereiten, und dieses zeigte die größte Ähnlichkeit mit dem Dibenzoylornithin, welches Jaffé unter dem Namen „Ornithursäure" beschrieben hat, und aus welchem auch das Ornithin selbst zuerst gewonnen wurde.

Nur in einem Punkte besteht eine Verschiedenheit. Das natürliche Produkt ist optisch-aktiv. Allerdings lag darüber bisher keine Angabe vor. Aber der Entdecker der Ornithursäure hatte die Güte, mir eine Probe seines Präparates zur Verfügung zu stellen, und ich habe damit folgende Bestimmung ausgeführt.

Eine Lösung von 0,4561 g in 1,5 ccm Normal-Kalilauge und 2,7 ccm Wasser, welche das Gesamtgewicht 4,74 g und das spez. Gewicht 1,033 hatte, drehte im 1-Dezimeterrohr bei 20° das Natriumlicht 0,78° nach rechts. Mithin in alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20^\circ} = +7,85^\circ$.

In Übereinstimmung damit steht die Beobachtung von Schulze und Winterstein, daß Ornithin mit Cyanamid zu Arginin, dessen Aktivität bekannt ist, vereinigt werden kann.

Die synthetische α, δ-Diaminovaleriansäure ist somit als die racemische Form des Ornithins aufzufassen.

Das Verfahren, welches zur Synthese der α, δ-Diaminovaleriansäure gedient hat, ist, wie leicht begreiflich, verschiedener Variationen fähig.

Seine Übertragung auf den schon von Gabriel und Maaß[1]) dargestellten Phtalimidobutylmalonsäureester

$$C_6H_4\langle{}^{CO}_{CO}\rangle N.CH_2.CH_2.CH_2.CH_2.CH(COOC_2H_5)_2$$

wird voraussichtlich das inaktive Lysin liefern, und noch leichter dürfte aus dem Phtalimidoäthylmalonsäureester

$$C_6H_4(CO)_2N.CH_2.CH_2.CH(CO_2C_2H_5)_2$$

die α, γ-Diaminobuttersäure zu gewinnen sein. An Stelle von Ammoniak werden sich wahrscheinlich auch Amine oder Guanidin mit der Phtalimidobromvaleriansäure kombinieren lassen, und die Anwendung der letzten Base müßte zum Arginin oder einem damit isomeren Produkte führen. Ich beabsichtige, diese Versuche auszuführen.

Phtalimidopropylbrommalonsäurediäthylester,

$$C_6H_4\langle{}^{CO}_{CO}\rangle N.CH_2.CH_2.CH_2CBr(CO_2C_2H_5)_2 .$$

Ein Gemisch von 100 g Phtalimidopropylmalonsäureester, 400 ccm Chloroform und 57 g Brom wird dem Tageslicht ausgesetzt. Je intensiver dasselbe ist, um so rascher vollzieht sich die Bromierung. An hellen Tagen ist sie in 24 Stunden, bei trübem Wetter erst in 2—3 Tagen beendet. Der allergrößte Teil des Broms verschwindet dabei, und es entweicht viel Bromwasserstoff. Zum Schluß wird die schwach rotbraune Lösung mit Wasser geschüttelt, mit wenig schwefliger Säure entfärbt und nach dem Abheben des Wassers das Chloroform verdampft. Den dickflüssigen Rückstand löst man in 50 ccm heißem Alkohol und kühlt auf —20° ab. Dabei fällt die Bromverbindung erst als farbloses Öl aus, erstarrt aber beim Rühren kristallinisch. Die Ausbeute betrug 82 g und die konzentrierte Mutterlauge gab als zweite Kristallisation 13 g. Die Gesamtausbeute betrug mithin 78% der Theorie, und das Präparat ist für alle weiteren Zwecke direkt zu gebrauchen.

Für die Analyse war die Substanz aus warmem Ligroïn umkristallisiert und im Vakuum getrocknet.

0,2979 g Sbst.: 0,1321 g AgBr. — 0,2013 g Sbst.: 0,3727 g CO_2, 0,0856 g H_2O.

$C_{18}H_{20}O_6NBr$.	Ber. C 50,70,	H 4,69,	Br 18,78.
	Gef. „ 50,50,	„ 4,73,	„ 18,87.

[1]) Berichte d. d. chem .Gesellsch. **32**, 1266 [1899].

Die Verbindung schmilzt bei 51° (korr.) und zersetzt sich bei höherer Temperatur. Sie löst sich äußerst leicht in warmem Alkohol und kristallisiert daraus beim Erkalten oder Abdunsten in farblosen kurzen Prismen oder Tafeln. In Äther ist sie auch noch recht leicht, dagegen in Petroläther auch in der Wärme schwer löslich. Beim Erkalten fällt sie daraus zuerst als Öl aus.

Gegen Alkalien ist sie sehr empfindlich, denn sie wird von alkoholischem Kali schon bei gewöhnlicher Temperatur ziemlich rasch unter Abscheidung von Bromkalium zersetzt.

Phtalimidopropylbrommalonsäureester und Ammoniak.

In reinem flüssigen Ammoniak löst sich der gebromte Ester bei gewöhnlicher Temperatur leicht, und beim 10-stündigen Erhitzen auf 50° wird er vollständig unter Abgabe des Halogens zersetzt. Da das Resultat bei Anwendung von alkoholischem Ammoniak das gleiche ist, so empfiehlt es sich der Bequemlichkeit halber, dieses anzuwenden.

15 g Bromverbindung werden mit 60 ccm gesättigtem alkoholischem Ammoniak im geschlossenen Rohr 12 Stunden auf 100° erhitzt, dann die braune Lösung auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand, aus dem bisher außer Phtalimid kein kristallisiertes Produkt isoliert werden konnte, mit der sechsfachen Gewichtsmenge Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 12 Stunden auf 100° erhitzt. Nach dem Erkalten ist der größere Teil der freigewordenen Phtalsäure abgeschieden. Man filtriert, verdampft die salzsaure Lösung auf dem Wasserbade und entfernt den Rest der Phtalsäure durch Ausäthern.

Der Rückstand enthält, außer Ammoniumsalzen, die Hydrochlorate der α-Pyrrolidincarbonsäure und anderer Verbindungen. Er wird in etwa 20 Teilen Wasser gelöst, durch mehrstündiges Kochen mit gelbem Bleioxyd von Halogen und Ammoniak befreit, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und die Lösung eingedampft. Es bleibt ein in Wasser sehr leicht löslicher, brauner Sirup zurück, aus dem sich die α-Pyrrolidincarbonsäure am leichtesten als Kupfersalz abscheiden läßt.

Zu diesem Zweck löst man den Sirup in etwa 20 Teilen Wasser, kocht etwa eine Stunde mit überschüssigem gefällten Kupferoxyd und verdampft bis zur beginnenden Kristallisiation. Beim Erkalten scheidet sich der größte Teil des Salzes in blauen, glänzenden Blättchen ab, welche sich beim Trocknen violett färben, aber an feuchter Luft rasch wieder blau werden. Das Salz zeigte die von Willstätter angegebene Zusammensetzung.

0,3014 g Sbst. verloren bei 100° 0,0338 g H_2O.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2 H_2O$. Ber. H_2O 10,99. Gef. H_2O 11,21.

Das getrocknete Salz gab folgende Zahlen:

0,2676 g Sbst.: 0,0726 g CuO. — 0,2392 g Sbst.: 20,3 ccm N (16°, 759 mm). — 0,2334 g Sbst.: 0,3487 g CO_2, 0,1181 g H_2O.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$. Ber. Cu 21,81, N 9,60, C 41,15, H 5,48.
Gef. „ 21,73, „ 9,88, „ 40,75, „ 5,62.

Die Ausbeute läßt viel zu wünschen übrig, denn 50 g Phtalimidopropylbrommalonsäureester gaben nur 4 g des reinen Kupfersalzes.

Zur Gewinnung der freien Säure wird das Kupfersalz in etwa der zehnfachen Menge heißem Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat verdampft und der kristallinische Rückstand aus heißem Alkohol umkristallisiert. Für die Analyse war die Substanz im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid getrocknet.

0,1759 g Sbst.: 0,3342 g CO_2, 0,1267 g H_2O.

$C_5H_9NO_2$. Ber. C 52,18, H 7,83.
Gef. „ 51,82, „ 8,00.

Die reine Säure schmolz beim raschen Erhitzen gegen 205° unter Aufschäumen, während Willstätter 198° angibt. Die Differenz ist nicht auffallend, da die Substanz sich zersetzt.

Sie wird aus schwefelsaurer Lösung, auch wenn dieselbe verdünnt ist, durch Phosphorwolframsäure gefällt. Der kristallinische Niederschlag löst sich aber ziemlich leicht beim Kochen.

Die Pyrrolidincarbonsäure verbindet sich in alkalischer Lösung leicht mit Phenylcyanat, und bevor mir die Isolierung mit dem Kupfersalz und die Identität mit der Substanz von Willstätter bekannt war, habe ich jene Verbindung zur Abscheidung der Säure aus dem rohen Sirup benutzt.

Löst man 1 Teil des letzteren mit 1 Teil 33-prozentiger Natronlauge in 5 Teilen Wasser und fügt unter fortwährendem kräftigen Schütteln und Abkühlen allmählich 1,5 Teile Phenylcyanat und nach Bedürfnis noch Lauge zu, so scheidet die mit Tierkohle behandelte und filtrierte alkalische Flüssigkeit beim Ansäuern zunächst eine teigige Masse ab, welche aber nach längerem Stehen kristallinisch erstarrt. Zur Reinigung muß das Produkt mehrmals aus Aceton umkristallisiert werden. Für die Analyse war es im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1060 g Sbst.: 0,2411 g CO_2, 0,0593 g H_2O. — 0,1299 g Sbst.: 0,2945 g CO_2, 0,0736 g H_2O. — 0,1021 g Sbst.: 10,9 ccm N (21,5°, 758 mm). — 0,0868 g Sbst.: 9,3 ccm N (21,5°, 759 mm). — 0,1379 g Sbst.: 13,9 ccm N (13°, 755 mm).

$C_{12}H_{14}N_2O_3$. Ber. C 61,54, H 5,98, N 11,97.
Gef. „ 62,03, 61,83, „ 6,22, 6,29, „ 12,04, 12,15, 11,83.

Bequemer wird natürlich die Darstellung der Verbindung, wenn man von der reinen Pyrrolidincarbonsäure ausgeht und etwa $1^1/_4$ der berechneten Menge von Phenylcyanat anwendet. Die Ausbeute beträgt dann 80% der Theorie und das Produkt ist nahezu rein.

Phenylcyanatpyrrolidincarbonsäure,

```
CH2.CH2
 ·    ·
CH2  CH.COOH    ,
  \  /
   N.CO.NH.C6H5
```

wie ich die Verbindung vorläufig nennen will, schmilzt nicht ganz konstant unter Aufschäumen gegen 170° und geht dabei in ihr Anhydrid über. Sie ist in heißem Wasser recht schwer, dagegen in Alkohol und Aceton leicht löslich. Beim Erhitzen mit starker Salzsäure verliert sie, ebenso wie beim Erhitzen für sich, Wasser und gibt ein dem Hydantoïn vergleichbares Anhydrid, welchem man die Struktur

```
CH2.CH2
 ·    ·
CH2  CH.CO
  \  /    |
   N      |
    \     |
     CO.N.C6H5
```

zuschreiben muß.

Zur Gewinnung desselben wird die Phenylcyanatverbindung geschmolzen, bis das Aufschäumen beendet ist, oder in heißer 25-prozentiger Salzsäure gelöst, von welcher ungefähr die 25-fache Menge nötig ist, und zur Trockne verdampft. Die Substanz kristallisiert viel leichter als die ursprüngliche Säure aus heißem Alkohol in feinen, farblosen Prismen, welche bei 118° (korr.) schmelzen.

0,1480 g Sbst.: 0,3615 g CO_2, 0,0775 g H_2O. — 0,1711 g Sbst.: 19 ccm N (17°, 764 mm).

$C_{12}H_{12}N_2O_2$. Ber. C 66,67, H 5,56, N 12,96.
Gef. „ 66,62, „ 5,82, „ 12,96.

Sie löst sich in warmem Alkohol recht leicht, schwerer in Äther. Auch von heißem Wasser wird sie ziemlich leicht aufgenommen und kristallisiert beim Erkalten sehr rasch. In verdünnten kalten Alkalien ist sie nicht löslicher als in Wasser, beim Kochen damit geht sie aber in Lösung, scheidet sich beim Erkalten nicht wieder aus und wird also offenbar in die Säure zurückverwandelt.

Phtalimidopropylbrommalonsäure,

$C_6H_4(CO)_2N.CH_2.CH_2.CH_2.CBr(CO_2H)_2$.

Zur Verseifung werden 30 g des Esters mit 150 ccm Bromwasserstoffsäure vom spez. Gewicht 1,78 im geschlossenen Rohr 2 Stunden auf 50° erhitzt. Schon in der Kälte erfolgt klare Lösung des Esters und nach dem Erhitzen hat sich das gebildete Bromäthyl auf der wässerigen Lösung als Öl abgeschieden. Nach Öffnen des Rohres erwärmt man die Flüssigkeit auf 50—60°, um das Bromäthyl und einen Teil des Bromwasserstoffes zu verjagen. Dabei beginnt in der Regel schon die Kristallisation der Phtalimidopropylbrommalonsäure. Man fügt schließlich das gleiche Volumen Wasser hinzu, um den Bromwasserstoff weiter zu verdünnen und läßt längere Zeit bei 0° kristallisieren.

Die ausgeschiedene Säure, welche ein farbloses Kristallpulver bildet, wird filtriert und mit kaltem Wasser ausgewaschen. Die Mutterlaugen geben beim mehrtägigen Stehen noch eine geringe Kristallisation. Die Gesamtausbeute betrug 25 g aus 30 g Ester.

Zur Analyse diente eine Probe, welche in Äther gelöst und durch Ligroïn wieder abgeschieden war. Die an der Luft getrocknete Säure scheint 2 Mol. Wasser zu enthalten.

0,2014 g Sbst.: 0,3080 g CO_2 , 0,0665 g H_2O. — 0,1975 g Sbst.: 6,1 ccm N (17°, 755 mm). — 0,3088 g Sbst.: 0,1437 g AgBr.

$C_{14}H_{12}O_6NBr + 2H_2O$. Ber. C 41,40, H 3,90, N 3,40, Br 19,70.
Gef. „ 41,71, „ 3,67, „ 3,56, „ 19,82.

Sie verliert das Wasser teilweise, aber nicht vollständig, bei mehrtägigem Trocknen im Vakuumexsikkator. Beim längeren Erhitzen auf 100° schmilzt sie und erfährt dabei eine partielle weitergehende Zersetzung. Das ist der Grund, warum die Analyse der trocknen Substanz nicht ausgeführt wurde. Die Säure löst sich leicht in Alkohol, Aceton und Essigester und dann sukzessive immer schwerer in Äther, Benzol und Ligroïn.

δ-Phtalimido-α-bromvaleriansäure,

$$C_6H_4\langle{}^{CO}_{CO}\rangle N.CH_2.CH_2.CH_2.CHBr.CO_2H.$$

Wird die vorhergehende Säure im lufttrocknen Zustande in einem Bade auf 140—145° erhitzt, so verliert sie unter starkem Aufschäumen außer dem Kristallwasser auch Kohlensäure. Die Zersetzung ist nach etwa ³/₄ Stunden beendet, wenn die Gasentwickelung völlig aufgehört hat.

Der braune geschmolzene Rückstand beginnt nach einiger Zeit zu kristallisieren; rascher aber gelangt man zum Ziele, indem man ihn in

der etwa anderthalbfachen Gewichtsmenge warmen Benzols löst. Beim Abkühlen scheidet sich die Säure bald als dicker Kristallbrei ab, welcher abgesaugt, gepreßt und mit Ligroïn gewaschen wird. Die Ausbeute an diesem schon sehr reinen Produkt betrug 68% der angewandten kristallwasserhaltigen Dicarbonsäure oder 85% der Theorie. Für die Analyse diente ein Präparat, welches nochmals aus warmem Benzol umkristallisiert war.

0,1713 g Sbst.: 0,3002 g CO_2, 0,0580 g H_2O. — 0,2021 g Sbst.: 7,4 ccm N (16°, 765 mm). — 0,2329 g Sbst.: 0,1345 g AgBr.

$C_{13}H_{12}O_4NBr$. Ber. C 47,85, H 3,68, N 4,29, Br 24,54.
Gef. „ 47,79, „ 3,76, „ 4,29, „ 24,58.

Die Säure schmilzt bei 127—128° (korr.). Sie ist in Alkohol und Äther sehr leicht, in Ligroïn ziemlich schwer löslich. Auf heißem Wasser schmilzt sie, löst sich darin in erheblicher Menge und fällt beim Erkalten wieder als zähes Harz aus. Leicht wird sie von Alkalien und Ammoniak aufgenommen.

α,δ-Diaminovaleriansäure.

20 g der Phtalimidobromvaleriansäure werden in 100 ccm wässerigem Ammoniak, welches bei 0° gesättigt ist, gelöst, im geschlossenen Rohr 12 Stunden auf 50—55° erhitzt, dann die Flüssigkeit auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand mit 100 ccm konzentrierter Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 wiederum 12 Stunden im geschlossenen Rohr auf 100° erhitzt. Nach dem Erkalten wird die ausgeschiedene Phtalsäure filtriert, die salzsaure Lösung auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand zur völligen Entfernung der Phtalsäure wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Man erhält so einen wenig gefärbten, halb kristallinischen Brei, welcher Chlorammonium und das Hydrochlorat der Diaminovaleriansäure enthält.

Zur Charakterisierung der letzteren ist die Dibenzoylverbindung am meisten geeignet. Sie wurde aus dem Rohprodukt auf folgende Weise gewonnen.

5 g desselben, welche nach der Menge der angewandten Phtalimidobromvaleriansäure 2 g Diaminovaleriansäure hätten enthalten können, wurden in 50 ccm Wasser gelöst und dazu abwechselnd in kleinen Mengen unter kräftigem Umschütteln und Kühlen mit Eiswasser 11,5 g Benzoylchlorid und 18 ccm 33-prozentiger Natronlauge zugefügt, so daß die Reaktion der Lösung stets schwach alkalisch blieb. Die Operation nahm $1^1/_4$ Stunden in Anspruch, und es schied sich während derselben Benzamid ab, welches seine Entstehung dem anwesenden Ammoniak verdankt. Das alkalische Filtrat gab beim Ansäuern einen

dicken kristallinischen Niederschlag, welcher, neben viel Benzoësäure, die Dibenzoylaminovaleriansäure enthielt. Um die Abscheidung zu vervollständigen, ist es nötig, mindestens 12 Stunden stehen zu lassen. Um die Benzoësäure zu entfernen, wurde das Rohprodukt wiederholt mit Wasser ausgekocht. Der kristallinische Rückstand betrug 2,2 g, mithin 42% der Menge, welche theoretisch aus der angewandten Phtalimidobromvaleriansäure hätte entstehen können.

Zur Reinigung wurde er in ungefähr 12 Teilen heißem Alkohol gelöst. Nach starkem Abkühlen schied er sich daraus zum größten Teil, aber erst im Laufe von mehreren Stunden, als farblose, mikroskopische Nadeln ab.

Für die Analyse wurde das Präparat zum zweiten Male in derselben Weise kristallisiert und bei 100° getrocknet.

0,1572 g Sbst.: 0,3863 g CO_2, 0,0847 g H_2O. — 0,1940 g Sbst.: 13,4 ccm N (14°, 769 mm).

$C_{19}H_{20}N_2O_4$. Ber. C 67,06, H 5,88, N 8,24.
Gef. „ 67,02, „ 5,99, „ 8,23.

Wie schon erwähnt, zeigte das Produkt die größte Ähnlichkeit mit der Ornithursäure. Der Schmelzpunkt lag bei 184—185° (korr. 187—188°), während Jaffé 182°, Schulze und Winterstein 184° für Ornithursäure fanden. Charakteristisch für letztere ist ferner das Calciumsalz, welches sich bei der Umsetzung des Ammoniumsalzes mit Chlorcalcium erst in der Hitze ausscheidet. Genau die gleichen Erscheinungen fanden sich bei dem künstlichen Produkt.

Als 0,5 g desselben in 4 ccm Wasser und einigen Tropfen Ammoniak gelöst, dann der Überschuß der Base weggekocht und nun in der Kälte 2 ccm einer 10-prozentigen Chlorcalciumlösung zugefügt wurden, blieb die Mischung bei gewöhnlicher Temperatur klar, beim Erhitzen begann aber sehr bald die Abscheidung des kristallinischen Calciumsalzes, und nach einhalbstündigem Erwärmen auf dem Wasserbade war eine große Menge desselben ausgefallen.

Das Salz enthielt nach dem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure kein Wasser, und der Gehalt an Calcium entsprach der Formel $(C_{19}H_{19}N_2O_4)_2Ca$.

0,2029 g Sbst.: 0,0157 g CaO.

$(C_{19}H_{19}N_2O_4)_2Ca$. Ber. Ca 5,57. Gef. Ca 5,53.

In rauchender Salzsäure löst sich die Dibenzoylverbindung in der Wärme sehr leicht, und nach halbstündigem Kochen war sie zum größten Teil unter Abspaltung von Benzoësäure zersetzt. Dabei entstand ebenfalls, wie es Jaffé für die Ornithursäure angegeben hat, eine andere, in heißem Wasser leicht lösliche, in Alkohol aber sehr schwer lösliche

Verbindung, welche bei 225° erweichte, gegen 238° unter Gasentwickelung völlig schmolz[1]), sich in verdünnter Salzsäure leicht löste und mithin wiederum dem Monobenzoylornithin außerordentlich ähnlich war. Nur in der Form der Kristalle zeigte sich ein Unterschied. Während Jaffé äußerst feine Nadeln beobachtete, kristallisierte mein Präparat aus heißem Wasser in feinen, glänzenden Blättchen, welche unter dem Mikroskop vielfach wie glatte Rhomben oder auch wie Dreiecke aussahen.

Die freie α, δ-Diaminovaleriansäure habe ich aus Mangel an Material nicht genauer untersuchen können.

Sie hat wie das Ornithin eine stark alkalische Reaktion, gibt mit Quecksilberchlorid eine flockige weiße Fällung und mit Phosphorwolframsäure in schwefelsaurer Lösung einen schweren kristallinischen Niederschlag, der in der Hitze ziemlich leicht löslich ist und beim Erkalten in farblosen Nadeln kristallisiert.

Alles in allem ist die Übereinstimmung mit dem Ornithin so außerordentlich groß, daß, abgesehen von der optischen Aktivität des natürlichen Produktes, die Identität mit dem synthetischen Präparat kaum bezweifelt werden kann.

Zum Schluß sage ich Herrn Dr. Bethmann für die wertvolle Hilfe bei obigen Versuchen besten Dank.

---

[1]) Vgl. Zeitschrift f. physiol. Chemie **26**, 6.

13. Emil Fischer: Synthese der α,γ-Diaminobuttersäure.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **34**, 2900 (1901).
(Eingegangen am 12. August.)

Die bisher unbekannte α,γ-Diaminobuttersäure läßt sich durch die gleiche Methode darstellen, welche ich für die künstliche Bereitung der α,δ-Diaminovaleriansäure[1]) (inaktives Ornithin) benutzt habe. Als Ausgangsmaterial dient der Phtalimidoäthylmalonsäureester,

$$C_6H_4(CO)_2N.CH_2.CH_2.CH(CO_2C_2H_5)_2,$$

welchen Aschan[2]) nach der allgemeinen Methode von Gabriel aus Bromäthylphtalimid und Natriummalonsäureester erhalten hat.

Derselbe tauscht den am tertiären Kohlenstoffatom haftenden Wasserstoff leicht gegen Brom aus, und die aus dem Bromprodukt durch Verseifung entstehende Phtalimidoäthylbrommalonsäure verliert beim Erhitzen ein Molekül Kohlensäure. Wird die so entstehende γ-Phtalimido-α-brombuttersäure,

$$C_6H_4(CO)_2N.CH_2.CH_2.CHBr.CO_2H$$

mit Ammoniak behandelt, so resultiert die entsprechende γ-Phtalimido-α-aminobuttersäure.

$$C_6H_4(CO)_2N.CH_2.CH_2.CH(NH_2).CO_2H,$$

welche beim Erhitzen mit starker Salzsäure in Phtalsäure und α,γ-Diaminobuttersäure,

$$\underset{NH_2}{CH_2}.CH_2.\underset{NH_2}{CH}.COOH$$

zerfällt.

Letztere zeigt, wie leicht begreiflich, große Ähnlichkeit einerseits mit der von Klebs[3]) dargestellten Diaminopropionsäure und anderer-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 454 [1901]. (*S. 211.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **24**, 2449 [1891].
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **26**, 2264 [1893] und Zeitschr. für physiol. Chem. **19**, 301.

seits mit dem Ornithin, zwischen denen sie nach ihrer Struktur die Mitte hält.

Phtalimidoäthylmalonsäurediäthylester.

Aschan hat die Verbindung in farblosen, bei 42—44⁰ schmelzenden Blättchen oder Prismen erhalten. Die Ausbeute an diesem reinen Produkt ist aber nach meiner Erfahrung so außerordentlich schlecht, daß für die weiteren Versuche das ölige Präparat verwandt werden mußte. Zur Bereitung desselben wurden zunächst genau nach der Vorschrift von Aschan 12 g Natrium in 120 ccm Alkohol gelöst, nach dem Abkühlen 100 g Malonsäureester und dann 100 g käufliches β-Bromäthylphtalimid zugegeben, 4 Stunden am Rückflußkühler gekocht, Alkohol und unveränderter Malonsäureester mit Wasserdampf abdestilliert, und das dicke Öl ausgeäthert. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde der Rückstand fünfmal mit je 600 ccm Ligroïn (Sdp. 55—65⁰) etwa $^1/_2$ Stunde am Rückflußkühler ausgekocht, die vereinigten Ligroïnauszüge verdampft und zur Entfernung des Lösungsmittels das auf dem Wasserbade erwärmte Öl mehrere Stunden mit einem getrockneten Luftstrom behandelt. Das so erhaltene, braune, in der Kälte zähflüssige Präparat, dessen Menge durchschnittlich 70—75 g betrug, diente für die Bereitung des

β-Phtalimidoäthylbrommalonsäurediäthylesters.

100 g des zuvor erwähnten sirupösen Phtalimidoäthylmalonsäureesters werden in 500 ccm Chloroform gelöst, mit 60 g Brom vermischt und dem Tageslicht ausgesetzt. Je nach der Intensität des letzteren verläuft die Reaktion verschieden rasch, erfordert aber gewöhnlich 2—3 Tage. Da das Brom im kleinen Überschuß vorhanden ist, so tritt keine völlige Entfärbung ein. Schließlich wird mit Wasser geschüttelt, durch schweflige Säure entfärbt und die abgehobene Chloroformlösung verdampft. Löst man den Rückstand, der durch das Eindampfen wieder etwas braun geworden ist, in der gleichen Menge heißem Alkohol und kühlt auf —20⁰ ab, so fällt der Phtalimidoäthylbrommalonsäureester in Gestalt farbloser Kristalle aus. Die Ausbeute betrug 70 g, was etwa 57% der Theorie, berechnet auf den Phtalimidoäthylmalonsäureester, oder 32%, berechnet auf das ursprüngliche Bromäthylphtalimid, entspricht. Für die Analyse wurde die Substanz nochmals aus Alkohol umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2268 g Sbst.: 0,1029 g AgBr. — 0,2008 g Sbst.: 0,3663 g CO_2, 0,0803 g H_2O. — 0,2002 g Sbst.: 0,3653 g CO_2, 0,0784 g H_2O.

$C_{17}H_{18}O_6NBr$.	Ber. C 49,51,	H 4,37,	Br 19,42.
	Gef. „ 49,75, 49,76,	„ 4,44, 4,35,	„ 19,34.

Die Verbindung schmilzt bei 76—78° (korr.) und zersetzt sich gegen 220—230° unter Gasentwickelung und Braunfärbung. In Alkohol löst sie sich sehr leicht und kristallisiert daraus in schönen, farblosen, abgestumpften Prismen. In Chloroform ist sie äußerst leicht löslich, weniger in Äther, und in Ligroïn recht schwer löslich. Von alkoholischem Kali wird sie sofort unter Abscheidung von Bromkalium zersetzt.

γ-Phtalimido-α-brombuttersäure,

$C_6H_4(CO)_2N.CH_2.CH_2.CHBr.CO_2H$.

Zur Verseifung werden 50 g des Phtalimidoäthylbrommalonsäureesters mit 250 ccm bei 0° gesättigter Bromwasserstoffsäure im Einschlußrohr 3 Stunden auf 50—55° erhitzt, nach dem Abkühlen das Rohr geöffnet, der Inhalt in einen Kolben gegossen, allmählich auf 50° erwärmt, zuletzt unter Durchsaugen eines Luftstromes, damit das Bromäthyl und die Hauptmenge des Bromwasserstoffes verjagt werden, und schließlich in Eis abgekühlt. Dabei fällt eine schwach gelb gefärbte, dicke Kristallmasse aus, welche auf Glaswolle stark abgesaugt, dann auf porösen Tonplatten und zuletzt auf dem Wasserbade getrocknet wird. Zur Reinigung löst man in warmem Äther, kocht mit etwas Tierkohle und fällt die eingeengte ätherische Lösung mit Petroläther. Das anfangs ausgeschiedene Öl erstarrt bald und bildet dann eine schöne, farblose Kristallmasse. Die Mutterlauge lieferte beim Eindampfen noch eine zweite, kleinere Kristallisation. Die Gesamtausbeute betrug 41 g. Dies Produkt besteht unzweifelhaft zum größten Teil aus Phtalimidoäthylbrommalonsäure, wurde aber nicht analysiert. Zur Überführung in die Monocarbonsäure erhitzt man das Präparat etwa $^3/_4$ Stunden in einem Bade auf 140—150°, wobei es durch Entwickelung von Kohlensäure stark aufgeschäumt und schließlich völlig schmilzt. Der braune Rückstand, welcher beim Abkühlen kristallinisch erstarrt, wird noch heiß, in ziemlich viel Äther gegossen, um ihn leichter zu lösen. Wird die durch Kochen mit Tierkohle entfärbte ätherische Flüssigkeit eingeengt und schließlich mit Petroläther versetzt, so fällt die Phtalimidoäthylbrombuttersäure als weiße Kristallmasse aus. Die Ausbeute betrug 34 g oder 89% der Theorie, berechnet auf den angewandten Phtalimidoäthylbrommalonsäureester. Das Präparat ist für die weitere Verarbeitung rein genug. Für die Analyse wurde es in $4^1/_2$ Teilen kochendem Benzol gelöst und bis zur Trübung Petroläther zugesetzt. Es schied sich dann in flachen Tafeln ab, welche bei 109° getrocknet wurden.

0,2244 g Sbst.: 0,1360 g AgBr. — 0,2002 g Sbst.: 0,3415 g CO_2, 0,0586 g H_2O. — 0,2165 g Sbst.: 8,8 ccm N (24°, 768 mm).

$C_{12}H_{10}O_4NBr$.	Ber.	C 46,15,	H 3,21,	N 4,49,	Br 25,64.
	Gef.	„ 46,52,	„ 3,25,	„ 4,61,	„ 25,79.

Die Verbindung schmilzt nach vorherigem Sintern bei 154—156° (korr.). Sie löst sich sehr leicht in Aceton, Chloroform, Alkohol und Äther, ziemlich leicht in heißem Wasser, schwer in Ligroïn. Ammoniak und Natronlauge lösen die Säure schon in der Kälte sehr leicht.

Einwirkung von Ammoniak auf Phtalimidobrombuttersäure.

Wasserfreies, flüssiges Ammoniak löst bei gewöhnlicher Temperatur die gebromte Säure leicht und substituiert das Halogen so schnell, daß die Reaktion nach etwa 12 Stunden beendet ist. Dabei entsteht, neben anderen Produkten das Phtalylderivat der α-γ-Diaminobuttersäure, $C_6H_4(CO)_2N.CH_2.CH_2.CH(NH_2).CO_2H$. Um dasselbe zu isolieren, wurde das Ammoniak verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst und mit gelbem Bleioxyd bis zur völligen Ausfällung des Halogens gekocht, dann das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und zur Kristallisation verdampft. Für die Analyse war das Präparat $1^1/_2$ Stunden bei 109° getrocknet.

0,1023 g Sbst.: 0,2174 g CO_2, 0,0487 g H_2O.

$C_{12}H_{12}O_4N_2$.	Ber.	C 58,06,	H 4,84.
	Gef.	„ 57,96,	„ 5,29.

Die Substanz schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 197° unter Zersetzung und kristallisiert aus heißem Wasser, in welchem sie ziemlich schwer löslich ist, beim Erkalten in kleinen, meist zu kugeligen Aggregaten vereinigten Blättchen. Da die Ausbeute wenig befriedigend und die Anwendung des flüssigen Ammoniaks außerdem unbequem war, so wurden größere Versuche mit wässerigem Ammoniak ausgeführt.

15 g Phtalimidobrombuttersäure wurden mit 75 ccm bei 0° gesättigtem Ammoniak im Einschlußrohr 12 Stunden auf 50—55° erwärmt, dann die schwach gelb gefärbte Lösung unter vermindertem Druck im Wasserbade verdampft, wobei der anfänglich sirupartige Rückstand allmählich kristallinisch wird. Ich halte es für wahrscheinlich, daß die ammoniakalische Lösung das Salz der entsprechenden Phtalaminosäure enthält, und daß dieses allmählich durch die Wärme in die kristallisierende Phtalyldiaminobuttersäure verwandelt wird. Der Rückstand wird in warmem Wasser gelöst, in einer Schale auf dem Wasserbade bis zur reichlichen Kristallisation eingeengt und auf 0° abgekühlt. Das

abgesaugte Produkt muß zur völligen Entfernung des Halogens nochmals aus heißem Wasser umkristallisiert werden. Die Mutterlaugen werden wieder zur Trockne verdampft und das ausgeschiedene Produkt auf die gleiche Art behandelt. Die Ausbeute betrug 5,5—6 g oder ungefähr 50% der Theorie.

Das Präparat zeigte ganz ähnliche Eigenschaften wie das mit flüssigem Ammoniak dargestellte, gab aber bei der Analyse 1% Kohlenstoff zu wenig.

0,1726 g Sbst.: 0,3611 g CO_2, 0,0805 g H_2O. — 0,2064 g Sbst.: 19,7 ccm N (24^0, 760 mm).

$C_{12}H_{12}O_4N_2$. Ber. C 58,06, H 4,84, N 11,29.
Gef. „ 57,06, „ 5,18, „ 10,71.

α,γ-Diaminobuttersäure, $NH_2.CH_2.CH_2.CH(NH_2).CO_2H$.

Zur Verseifung wird die zuvor beschriebene Phtalylverbindung mit der 12-fachen Gewichtsmenge Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 im Einschlußrohr 12 Stunden bei 100^0 geschüttelt, dann der Rohrinhalt mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, von der auskristallisierten Phtalsäure abfiltriert, auf dem Wasserbade zur Kristallisation verdampft und der Rückstand nach Zusatz von wenig Wasser so lange ausgeäthert, bis die Phtalsäure ganz entfernt ist. Man verdampft dann wieder auf dem Wasserbade bis zur Kristallisation und fällt das Hydrochlorat der Diaminobuttersäure vollends mit Alkohol und Äther. Das kristallinische Präparat ist nur schwach gelb, die Ausbeute beträgt 85—90% der Theorie.

Zur Verwandlung in die freie Diaminosäure wird das Hydrochlorat in etwa 20 Teilen kaltem Wasser gelöst, mit einem kleinen Überschuß von frisch gefälltem Silberoxyd geschüttelt, das Filtrat vorsichtig mit Salzsäure versetzt, bis gerade alles gelöste Silber wieder gefällt ist, und die nach dem Schütteln mit Tierkohle abermals filtrierte Lösung unter vermindertem Druck bei möglichstem Ausschluß von kohlensäurehaltiger Luft verdampft. Es hinterbleibt dabei ein zuerst sirupöser Rückstand, welcher nach dem Durchrühren mit Alkohol allmählich kristallinisch erstarrt. Das Präparat ist wegen seiner Hygroskopizität und wegen des kaum vermeidlichen Gehaltes an Kohlensäure für die Analyse nicht geeignet. Es ist in Wasser sehr leicht, in Alkohol und Holzgeist dagegen außerordentlich schwer löslich. Noch weniger wird es von Äther oder Ligroïn aufgenommen. Die wässerige Lösung reagiert stark alkalisch und zieht rasch Kohlensäure an. Die feste Substanz zersetzt sich beim Erhitzen. Von den Verbindungen mit Säuren ist das neutrale Oxalat am schönsten. Es kristallisiert mit 2 Mol. Wasser in schönen, farblosen,

häufig flächenreichen Tafeln, welche in wässeriger Lösung neutrale Reaktion zeigen.

Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz gab bei zweistündigem Erhitzen auf 109° ihr Kristallwasser ab.

0,4342 g Sbst.: 0,0424 g H_2O.

$(C_4H_{10}O_2N_2)_2.C_2H_2O_4 + 2\,H_2O$. Ber. H_2O 9,95. Gef. H_2O 9,77.

Die bei 109° getrocknete Substanz gab folgende Zahlen:

0,1759 g Sbst.: 0,2371 g CO_2, 0,1105 g H_2O. — 0,1435 g Sbst.: 21,4 ccm N (21°, 762 mm).

$(C_4H_{10}O_2N_2)_2.C_2H_2O_4$. Ber. C 36,81, H 6,75, N 17,18.
Gef. „ 36,76, „ 6,98, „ 17,02.

Das wasserhaltige Salz schmilzt, ebenso wie das getrocknete, gegen 219° (korr.) unter lebhafter Zersetzung. Es ist in heißem Wasser ziemlich leicht, in kaltem aber so schwer löslich, daß es aus einer 10-prozentigen Lösung beim Abkühlen in Eis bald ausfällt.

Die Salze mit Salpeter-, Schwefel- und Salzsäure sind in Wasser äußerst leicht, in Alkohol aber sehr schwer löslich. Auch das Chloroplatinat ist sehr leicht löslich, während das Aurochlorat sich rasch zersetzt. Phosphorwolframsäure erzeugt in der verdünnten schwefelsauren Lösung einen körnigen weißen Niederschlag, der sich in der Hitze in erheblicher Menge löst, beim Abkühlen rasch als schwere Kristallmasse wieder ausfällt und weder in überschüssiger Schwefelsäure noch Phosphorwolframsäure löslich ist. Quecksilberchlorid erzeugt in der wässerigen Lösung einen flockigen weißen Niederschlag. Das Kupfersalz, in der gewöhnlichen Weise bereitet, löst sich in Wasser äußerst leicht und mit tiefblauer Farbe.

Dibenzoyl-α,γ-Diaminobuttersäure,

$$\begin{array}{ccc} & CH_2.CH_2.CH.COOH & \\ C_6H_5.CO.\dot{N}H & & \dot{N}H.CO.C_6H_5 \end{array}.$$

Ebenso wie bei den Monoaminosäuren ist auch hier zur Erzielung einer guten Ausbeute bei der Benzoylierung ein erheblicher Überschuß von Benzoylchlorid, das Drei- bis Vierfache der Theorie, anzuwenden. Man löst die Diaminosäure oder ihr Hydrochlorat in Wasser und fügt dann abwechselnd unter kräftigem Schütteln in kleinen Portionen Benzoylchlorid und so viel Natronlauge hinzu, daß die Reaktion schwach alkalisch bleibt. Zum Schluß wird die alkalische Lösung mit Tierkohle geklärt, das Filtrat mit Salzsäure übersättigt, der Niederschlag nach längerem Stehen getrocknet und zur Entfernung der Benzoësäure zu-

erst mit Ligroïn und später mit Wasser ausgekocht. In der Hitze bildet die zurückbleibende Dibenzoyldiaminobuttersäure ein Öl, welches aber beim Abkühlen sofort erstarrt. Sie wird in heißem Alkohol gelöst. Aus der etwas eingeengten Flüssigkeit kristallisiert sie beim längeren Stehen in kleinen, meist zu kugeligen Aggregaten vereinigten Nädelchen, welche für die Analyse bei 109° getrocknet wurden.

0,1478 g Sbst.: 0,3573 g CO_2, 0,0759 g H_2O. — 0,2017 g Sbst.: 15 ccm N (22°, 756 mm).

$C_{18}H_{18}O_4N_2$. Ber. C 66,26, H 5,52, N 8,59.
Gef. ,, 65,93, ,, 5,71, ,, 8,38.

Der Schmelzpunkt der Säure liegt bei 200—201° (korr.), in heißem Alkohol ist sie sehr leicht löslich, sehr schwer in Wasser und Äther und unlöslich in Ligroïn.

Bei diesen Versuchen erfreute ich mich der Hilfe des Herrn Dr. F. Bethmann, wofür ich ihm besten Dank sage.

---

14. Emil Fischer und Fritz Weigert: Synthese der α,ε-Diaminocapronsäure (Inaktives Lysin).[1]

Bericht der deutschen chemischen Gesellschaft **35**, 3772 (1902).
(Eingegangen am 25. Oktober.)

In der Mitteilung über die Synthese der α,δ-Diaminovaleriansäure[2] wurde die Absicht ausgesprochen, auf ähnliche Weise die homologe α,ε-Diaminocapronsäure darzustellen und mit dem von Drechsel entdeckten und als Spaltungsprodukt vieler Proteïnstoffe wichtigen Lysin zu vergleichen. Da aber die Versuche wegen der schwierigen Beschaffung des Tetramethylenbromids sich allzu langwierig gestalteten, so haben wir uns bemüht, einen bequemeren Weg zu finden, und es ist uns nach verschiedenen fruchtlosen Anläufen gelungen, auf folgende Weise das Ziel zu erreichen.

Der von Blank[3] beschriebene γ-Cyanpropylmalonester,

$$NC.CH_2.CH_2.CH_2.CH(COOC_2H_5)_2\ ,$$

erleidet durch salpeterige Säure dieselbe Verwandlung, welche Victor Meyer für die Monoalkylacetessigester aufgefunden hat und welche nach einer kurzen Bemerkung von Dieckmann und Groeneveld[4] auch bei dem Methylmalonester eintritt. Unter Austritt von einem Carboxäthyl entsteht nämlich der α-Oximido-δ-cyanvaleriansäureäthylester,

$$NC.CH_2.CH_2.CH_2.C(:N.OH).COOC_2H_5\ .$$

Wird diese Verbindung mit Alkohol und Natrium reduziert, so bildet sich in verhältnismäßig glatter Weise die α,ε-Diaminocapronsäure,

$$H_2N.CH_2.CH_2.CH_2.CH_2.CH(NH_2).COOH\ .$$

Das synthetische Produkt hat die größte Ähnlichkeit mit dem natürlichen Lysin, wie der Vergleich verschiedener Salze, sowie der

---

[1]) Der Berliner Akademie vorgelegt am 13. März 1902. Vgl. Sitzungsberichte **1902**, 270 und Chem. Centralblatt **1902**, I, 985.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 454 [1901]. (*S. 214.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **25**, 3041 [1892].

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 601 [1900].

Benzoyl- und Phenylcyanatverbindungen zeigte. Es unterscheidet sich davon nur durch die optische Inaktivität und kleine Differenzen in den Schmelzpunkten der Derivate.

Es war deshalb sehr wahrscheinlich, daß die künstliche Diaminosäure die racemische Form des Lysins sei. Um aber den endgültigen Beweis dafür zu liefern, haben wir die natürliche Base durch Erhitzen mit Salzsäure auf 165—170° racemisiert und konnten dann keinen Unterschied zwischen ihr und dem künstlichen Produkt mehr feststellen.

Da die Synthese nur wenige Operationen mit verhältnismäßig billigen Materialien erfordert, so dürfte das künstliche Produkt ebenso leicht als das natürliche zu beschaffen sein.

Durch das Resultat der Synthese wird ferner der definitive Beweis für die Richtigkeit der schon jetzt üblichen Strukturformel des Lysins, in der die Stellung des Carboxyls noch unsicher war, geliefert.

γ-Cyanpropyl-malonester.

Zur Bereitung des Esters wurden nach der Vorschrift von Blank 7 Teile Natrium in 55 Teilen absolutem Alkohol gelöst, dann 48 Teile Malonester und 33 Teile γ-Chlorbutyronitril zugegeben. Das Erhitzen geschah aber nicht am Rückflußkühler, sondern im verschlossenen Gefäß (Druckflasche oder Autoklaven) im Wasserbade und dauerte 15 Stunden. Dann wurde der Alkohol und das unveränderte Nitril mit Wasserdampf abgeblasen, das ausgeschiedene Öl ausgeäthert und nach dem Verdampfen des Äthers und Trocknen mit Kaliumcarbonat unter stark vermindertem Druck fraktioniert; der Siedepunkt lag unter 11—12 mm Druck bei 175° (korr.). Die Ausbeute betrug durchschnittlich 35 Teile oder 52% der Theorie, während Blank nur 13% nichtdestillierten Ester erhielt.

α-Oximido-δ-cyanvaleriansäureäthylester, $NC.CH_2.CH_2.CH_2.C(:N.OH).COOC_2H_5$.

Mischt man 10 g Cyanpropylmalonester bei 0° mit 5 g Äthylnitrit, so färbt sich die Flüssigkeit schwach gelblich grün. Diese wird allmählich in eine unter —10° abgekühlte Lösung von 1 g Natrium in 20 ccm absolutem Alkohol eingetragen und das Gemisch unter fortwährender Kühlung durch Eis und Salz 15 Stunden verschlossen aufbewahrt, wobei die anfangs dunkelgelbe Farbe in braun umschlägt. Der Alkohol wird jetzt im Vakuum über Schwefelsäure verdunstet, der halb erstarrte braune Rückstand, welcher einen süßlichen kaffeeartigen Geruch hat, in wenig Wasser gelöst, das ausgeschiedene Öl mit Äther entfernt und die wässerige Lösung des Natriumsalzes unter Kühlung mit verdünnter

Schwefelsäure übersättigt. Dabei fällt der α-Oximido-δ-cyanvaleriansäureester als dunkelbraunes Öl aus und wird durch mehrmaliges Ausziehen mit Äther abgetrennt. Das beim Verdunsten des Äthers zurückbleibende Öl erstarrt beim Aufbewahren im Vakuum über Schwefelsäure kristallinisch. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug bei gut gelungener Operation 7,6 g oder 93% der Theorie. Es kann für die Reduktion mit Natrium und Alkohol direkt verwendet werden. Zur völligen Reinigung wird die kristallinische Masse zunächst durch Aufstreichen auf Ton oder Abpressen von einer kleinen Menge Öl befreit und dann aus Ligroïn vom Sdp. 90—100° umkristallisiert. Beim Abkühlen fällt der Ester erst in Öltropfen aus, welche sich nach einiger Zeit in sehr dünne langgestreckte, schief abgeschnittene, farblose Platten vom Schmp. 74° verwandeln. Für die Analyse war das Präparat im Vakuum getrocknet.

0,1500 g Sbst.: 0,2854 g CO_2, 0,0853 g H_2O. — 0,1724 g Sbst.: 22,9 ccm N (19,5°, 762 mm).

$C_8H_{12}N_2O_3$. Ber. C 52,13, H 6,56, N 15,24.
Gef. „ 51,90, „ 6,36, „ 15,37.

Der Ester ist in Wasser und in Ligroïn auch in der Wärme recht schwer, in den anderen gebräuchlichen Lösungsmitteln dagegen sehr leicht löslich. Von Alkalien wird er infolge der Salzbildung sehr leicht aufgenommen. Beim Kochen mit starker Salzsäure wird er unter Abspaltung von Hydroxylamin zerlegt.

α,ε-Diaminocapronsäure,

$H_2N.CH_2.CH_2.CH_2.CH_2.CH(NH_2).COOH$.

7,6 g des rohen α-Oximido-δ-cyanvaleriansäureesters, welche 10 g Cyanpropylmalonester entsprechen, werden in 600 ccm absolutem Alkohol gelöst und in die am Rückflußkühler siedende Flüssigkeit unter häufigem Umschütteln möglichst rasch 60 g Natrium in dünnen Scheiben eingetragen. Die Operation nimmt $1^1/_4$—$1^1/_2$ Stunden in Anspruch. Jetzt ist es nötig, der alkoholischen Lösung etwa 60 ccm Wasser zuzufügen und $^3/_4$ Stunden am Rückflußkühler zu kochen, um ester- und anhydridartige Produkte zu verseifen. Die alkalische Lösung wird dann gut gekühlt und zur Entfernung des Natriums eine ebenfalls gekühlte Mischung von 80 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 120 ccm Wasser unter Umrühren zugetropft. Zum Schluß muß die Flüssigkeit stark sauer reagieren. Das Natriumsulfat wird abgesaugt, mit Alkohol nachgewaschen, dann die alkoholische Lösung unter vermindertem Druck auf etwa 250 ccm eingeengt und der Rest des Alkohols mit Wasserdampf abgeblasen. Zur Isolierung der Diaminosäure diente die sukzessive

Überführung in das Phosphorwolframat und Pikrat, welche Kossel und Kutscher[1]) für die Abscheidung des Lysins empfohlen haben. Zu dem Zweck wurde die wässerige Lösung mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß der Gehalt an freier Säure 5% betrug, und eine konzentrierte Lösung von 60 g Phosphorwolframsäure zugefügt. Der scharf abgesaugte, mit kaltem Wasser gewaschene Niederschlag wurde in der üblichen Weise mit Barytwasser zersetzt, die Barytlösung mit Wasserdampf behandelt, bis die flüchtigen Basen entfernt waren, in der Hitze mit Kohlensäure gefällt und das Filtrat auf dem Wasserbade verdampft. Dabei blieb ein bräunlich gefärbter, stark alkalisch reagierender, dicker Sirup zurück, dessen Menge 4,6 g betrug.

Zur Umwandlung in das Pikrat wurde derselbe mit Alkohol übergossen, wobei er zu Klumpen zusammenballte, und eine starke alkoholische Lösung von Pikrinsäure unter sorgfältigem Umrühren solange zugefügt, als dadurch noch eine gelbliche Trübung der Flüssigkeit hervorgerufen wurde. Die hierbei entstehende, anfangs bräunlich gelbe, zähe Masse erstarrte beim längeren Durchkneten kristallinisch. Sie wurde zum Schluß filtriert, mit Alkohol gewaschen und bei 100° getrocknet. Die Menge des Pikrats betrug 5,3 g oder 32% der Theorie. Durch Verarbeitung der Mutterlaugen konnten noch 3% gewonnen werden. Zur Analyse wurde das Pikrat zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert und bei 100° getrocknet.

0,1415 g Sbst.: 0,2011 g CO_2, 0,0595 g H_2O. — 0,1569 g Sbst.: 25,2 ccm N (19°, 757,5 mm).

$C_{12}H_{17}O_9N_5$. Ber. C 38,40, H 4,53, N 18,66.
Gef. „ 38,77, „ 4,71, „ 18,51.

Das Salz kristallisiert aus heißem Wasser, worin es ziemlich leicht löslich ist, in hellgelben, mikroskopisch kleinen, kurzen und ziemlich dicken Nadeln, die Kristalle sind aber nicht so schön ausgebildet wie diejenigen des natürlichen Lysinpikrats. Dagegen verhalten sich beide Salze ganz gleich beim Erhitzen im Kapillarrohr, denn sie färben sich gleichzeitig gegen 230° dunkel und zersetzen sich. Beide Präparate sind in absolutem Alkohol sehr schwer und in Benzol und Äther ganz unlöslich.

Zur Umwandlung des Pikrats in das Chlorhydrat wurde 1 g in 15 ccm heißem Wasser gelöst, mit 2,5 ccm rauchender Salzsäure versetzt, abgekühlt, von der Pikrinsäure abfiltriert und die Flüssigkeit mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Durch Behandeln mit Tierkohle wurde dann die wässerige Lösung entfärbt und im Exsikkator zur Trockne

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 177 [1900].

verdunstet. Dabei blieb das Hydrochlorat als kristallinische Masse zurück, die von einer geringen Menge gelber Mutterlauge durch scharfes Abpressen befreit wurde. Das Salz war äußerst leicht löslich in Wasser. Im Kapillarrohr erhitzt, wurde es gegen 182° weich und schmolz zwischen 183 und 186° (korr.). Ungefähr denselben Schmelzpunkt zeigten zwei Proben, die aus heißem Eisessig bzw. wenig heißem Alkohol umkristallisiert waren. Für das aktive Lysinchlorhydrat wird von Henderson[1]) der Schmp. 192—193° angegeben.

Zum weiteren Vergleich des künstlichen und natürlichen Produktes dienten die Benzoyl- und Phenylcyanatverbindung.

Inaktives Dibenzoyllysin.

Das Derivat des natürlichen Lysins ist zuerst von Drechsel[2]) und dann von Clara Wildenow[3]) nach der Schotten-Baumannschen Reaktion dargestellt und unter dem Namen Lysursäure beschrieben worden. Wir haben die gleiche Verbindung aus der künstlichen inaktiven Base auf folgende Weise bereitet. Zu salzsaurem inaktivem Lysin wurden unter starker Kühlung allmählich Benzoylchlorid und Natronlauge unter starkem Schütteln zugegeben, so daß immer der Geruch des Chlorids verschwand. Für die Ausbeute ist es vorteilhaft, die Menge des Benzoylchlorids so groß zu wählen, daß sie etwa das Dreifache der Theorie beträgt. Zum Schluß wird angesäuert, der Niederschlag nach einiger Zeit abgesaugt, getrocknet und mehrmals mit hochsiedendem Ligroïn ausgekocht, um die Benzoësäure zu entfernen. Dabei bleibt die gesuchte Dibenzoylverbindung als graues Pulver zurück. Die Ausbeute betrug 80% der theoretischen. Zur Reinigung wurde das Produkt zuerst aus wenig heißem Aceton und dann für die Analyse noch zweimal aus warmem Alkohol umkristallisiert.

0,1825 g Sbst.: 0,4512 g CO_2, 0,1031 g H_2O. — 0,2052 g Sbst.: 14,4 ccm N (18,5°, 767 mm).

$C_{20}H_{22}O_4N_2$. Ber. C 67,80, H 6,22, N 7,91.
Gef. „ 67,51, „ 6,32, „ 8,19.

Die Verbindung kristallisiert in farblosen, schief abgeschnittenen Plättchen und schmilzt bei 145—146° (korr.), mithin nahezu bei derselben Temperatur, wie der aktive Körper (144°). Sie ist in Alkohol und Aceton recht leicht, in Wasser, Äther, Benzol und Chloroform schwer löslich.

---

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. **29**, 321 [1900].
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **28**, 3189 [1895].
[3]) Zeitschr. für physiol. Chem. **25**, 527 [1898].

Durch längeres Kochen mit Salzsäure wird sie in inaktives Lysin zurückverwandelt. Als Zwischenprodukt entsteht dabei das

inaktive Monobenzoyllysin.

Für die Bereitung desselben werden 2 g der Dibenzoylverbindung mit 90 ccm Salzsäure (spez. Gewicht 1,1) $1^1/_2$ Stunden am Rückflußkühler gekocht, und die salzsaure Lösung im Vakuum bei etwa 40° eingedampft. Versetzt man den Rückstand mit wenig Wasser, filtriert von der ausgeschiedenen Benzoësäure ab und fügt zu dem Filtrat vorsichtig Ammoniak bis zur neutralen Reaktion, so kristallisiert, besonders beim Reiben, nach einiger Zeit die Monobenzoylverbindung in feinen farblosen Nadeln, während das gleichzeitig entstandene Lysin in der Mutterlauge bleibt. Die Ausbeute beträgt 40% der theoretischen. Die Verbindung ist in heißem Wasser leicht löslich und läßt sich daraus bequem umkristallisieren; sie ist schwer löslich in Alkohol, unlöslich in Äther, Aceton, Chloroform, Benzol, Ligroïn. Für die Analyse diente ein mehrfach umkristallisiertes und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknetes Präparat.

0,1604 g Sbst.: 0,3671 g CO_2, 0,1048 g H_2O. — 0,1579 g Sbst.: 16,1 ccm N (20°, 762 mm).

$C_{13}H_{18}N_2O_3$. Ber. C 62,40, H 7,20, N 11,20.
Gef. „ 62,40, „ 7,31, „ 11,74.

Das analysierte Präparat schmolz bei 235°, aber der Schmelzpunkt scheint zu schwanken, denn bei einem anderen Produkt fanden wir ihn bei 249°. Ähnliche Erfahrungen hat man bei dem Monobenzoylornithin gemacht[1]). Vielleicht beruht die Erscheinung darauf, daß die Präparate Gemische der beiden Isomeren sind, welche aus der Dibenzoylverbindung entstehen können. Das inaktive Monobenzoyllysin reagiert neutral gegen Lakmus und hat noch basische Eigenschaften, denn es löst sich leicht in Mineralsäuren, wird aber aus der sauren Lösung zum Unterschied vom Lysin durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt.

Phenylcyanatverbindung des inaktiven Lysins.

Vor kurzem hat R. O. Herzog[2]) gezeigt, daß das natürliche Lysin in alkalischer Lösung 2 Mol. Phenylcyanat aufnimmt, und daß die so entstehende Ureïdosäure beim Erhitzen mit Salzsäure 1 Mol. Wasser

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **11**, 408 [1878]; **34**, 463 [1901]; Zeitschr. für physiolog. Chem. **26**, 6 [1898].

[2]) Zeitschr. für physiol. Chem. **34**, 525 [1902].

verliert. Ganz die gleichen Erscheinungen haben wir bei der synthetischen α,ε-Diaminocapronsäure beobachtet.

1 g Pikrat wurde in der oben beschriebenen Weise in das Hydrochlorat übergeführt, dieses ohne weitere Reinigung in 5 ccm Wasser gelöst, mit 0,8 ccm Natronlauge von 30% versetzt und unter guter Kühlung und fortwährendem Schütteln allmählich mit 1 g Phenylcyanat behandelt. Nach 24-stündigem Stehen wurde die Flüssigkeit vom ausgeschiedenen Harz filtriert und mit Schwefelsäure angesäuert. Der ausgeschiedene, flockige, farblose Niederschlag wurde filtriert, gewaschen und mit 30-prozentiger Salzsäure gekocht, bis er nach vorheriger Schmelzung in Lösung gegangen war. Das Erhitzen darf nicht zu lange, etwa $^1/_4$ Stunde, fortgesetzt werden, weil sonst sekundäre Vorgänge stattfinden. Beim Abkühlen und Verdünnen mit Wasser fiel die neue Verbindung zunächst als harzige Masse aus, welche aber bald erstarrte. Nach dem Filtrieren und Waschen mit Wasser wurde sie aus heißem Alkohol umkristallisiert. Die so erhaltenen, farblosen, dünnen Nadeln, welche häufig zu warzenförmigen Aggregaten vereinigt sind, begannen bei 182° (korr.) zu sintern und waren bei 185° (korr.) zu einer nahezu farblosen Flüssigkeit geschmolzen. Für die Analyse diente ein nochmals aus Alkohol umkristallisiertes und bei 109° getrocknetes Präparat.

0,1431 g Sbst.: 0,3447 g CO_2, 0,0801 g H_2O. — 0,1202 g Sbst.: 15,2 ccm N (12°, 767 mm).

$C_{20}H_{22}O_3N_4$. Ber. C 65,60, H 6,02, N 15,30.
Gef. „ 65,69, „ 6,22, „ 15,22.

Die Substanz ist in Wasser so gut wie unlöslich und auch in starker heißer Salzsäure ziemlich schwer löslich. Sie gleicht durchaus dem Phenylcyanatderivat des aktiven Lysins, nur im Schmelzpunkt zeigt sich wieder eine Differenz. Herzog gibt denselben für die natürliche Verbindung zu 183—184° (nicht korr.) an, während wir ihn etwas höher, bei 196° (korr.), fanden.

Schließlich haben wir die gleiche Phenylcyanatverbindung aus einem natürlichen, aber zuvor racemisierten Lysin bereitet. Diese Racemisierung ist schon von M. Siegfried[1]) durch Erhitzen mit Barytwasser ausgeführt worden. Wir fanden es bequemer, sie in salzsaurer Lösung zu bewerkstelligen. Zu dem Zweck wurde natürliches, salzsaures Lysin, welches aus dem Pikrat hergestellt war, mit der 20-fachen Menge 20-prozentiger Salzsäure im geschlossenen Rohr 15 Stunden im Volhardschen Petroleumofen auf 165—170° erhitzt und die salzsaure

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 24, 431 [1891].

Lösung, welche nur noch den 20. Teil des ursprünglichen Drehungsvermögens besaß, verdampft. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde dann die Phenylcyanatverbindung in der gewöhnlichen Weise bereitet. Das Produkt zeigte in dem Habitus der Kristalle und im Schmelzpunkt völlige Übereinstimmung mit dem synthetischen Material, und da auch beim Vermischen von zwei Vergleichsproben keine Schmelzpunktserniedrigung eintrat, so halten wir uns für berechtigt, die beiden Substanzen für identisch zu erklären.

Zum Schluß sagen wir den Herren A. Kossel und M. Siegfried für die Überlassung von natürlichem Lysin, welches zu den obigen Proben diente, unseren besten Dank.

---

15. Emil Fischer und Fritz Schlotterbeck: Verwandlung der Sorbinsäure in Aminosäuren.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **37**, 2357 (1904).
(Eingegangen am 1. Juni.)

Nach den Beobachtungen von R. Engel[1]) lassen sich die ungesättigten Säuren mit Ammoniak zu Aminosäuren kombinieren.

So entsteht aus der Fumarsäure die inaktive Asparaginsäure und aus der Crotonsäure eine Aminobuttersäure, von der schon Engel vermutete, daß sie die β-Verbindung sei, was vor einigen Jahren durch die Beobachtungen von E. Fischer und Röder[2]) bestätigt wurde. Bald nach den Arbeiten von Engel hat Wender im Anschluß an die Versuche von Körner und Menozzi gezeigt, daß sich durch Einwirkung von Ammoniak auf Acrylsäureester β-Aminopropionäther erhalten läßt. Die Reaktion von Engel hat bisher keine große praktische Bedeutung gewonnen, wie es scheint, wegen der unbefriedigenden Ausbeute, die sie in vielen Fällen gibt. Schon Engel hat darauf hingewiesen und als Grund dafür die umgekehrte Zerlegung der Aminosäuren unter Abspaltung von Ammoniak bei der meist ziemlich hoch gelegenen Temperatur des Prozesses angegeben.

In der Tat besitzen wir für die Synthese der Monoaminosäuren, zumal der wichtigen α-Verbindungen, mehrere viel bequemere Methoden. Schwieriger ist schon die Synthese der Diaminosäuren, besonders derjenigen, die die beiden Aminogruppen in 1,3- oder 1,4-Stellung zueinander enthalten. Um eine neue Methode für die Synthese dieser Substanzen zu erlangen, haben wir deshalb geglaubt, das Verhalten der doppelt ungesättigten Säuren gegen Ammoniak prüfen zu sollen. Die Resultate, die die Untersuchung der Sorbinsäure uns bisher geliefert, sprechen in der Tat dafür, daß man diesen Weg in mehreren Fällen mit Vorteil gehen kann. Wird die Säure nämlich mit einem

---

[1]) Engel, Compt. rend. **104**, 1805 [1887], **106**, 1677 [1888]. Vgl. auch Körner und Menozzi, Ber. **21**, Ref. 86 [1888]; **22**, Ref. 735 [1889]. Wender, Ber. **22**, Ref. 736 [1889].

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 3755 [1901].

großen Überschuß von konzentriertem wässerigen Ammoniak längere Zeit auf 150⁰ erhitzt, so verschwindet sie vollständig, und als Hauptprodukt entsteht ein Körper, den wir zwar nicht kristallisiert erhielten, der aber alle die gewöhnlichen Merkmale der Diaminosäuren besitzt und dem wir nach der Analyse des Pikrats die Formel $C_6H_{14}N_2O_2$ glauben zuschreiben zu dürfen. Sie würde also eine Diaminocapronsäure sein, ist aber verschieden von der bekannten α,ε-Verbindung (inaktives Lysin). Wird die sirupöse Substanz längere Zeit auf 150⁰ erhitzt oder unter stark vermindertem Druck destilliert, so geht sie unter gleichzeitiger Entwickelung von Ammoniak partiell in ein kristallinisches Produkt C_6H_9NO über. Letzteres läßt sich betrachten als das Anhydrid einer ungesättigten Aminosäure $C_6H_{11}NO_2$, die wir mit Rücksicht auf ihre Abstammung für ein Derivat der normalen Capronsäure halten und deshalb vorläufig Aminohexensäure nennen.

Aller Wahrscheinlichkeit nach ist das Anhydrid das ungesättigte Derivat eines methylierten Piperidons oder Pyrrolidons. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß in der ursprünglichen Diaminocapronsäure eine Aminogruppe in der γ- oder δ-Stellung zum Carboxyl sich befindet. Für die Stellung der zweiten Aminogruppe fehlen bisher die entscheidenden Kriterien.

Einwirkung von Ammoniak auf Sorbinsäure.

Die Addition des Ammoniaks findet in wässeriger Lösung unter 130⁰ fast gar nicht statt, und zur völligen Umwandlung in die Aminosäure ist sogar andauerndes Erhitzen mit überschüssigem Ammoniak auf 150⁰ erforderlich. Nach mannigfachen Versuchen sind wir schließlich bei folgendem Verfahren stehen geblieben:

10 g Sorbinsäure werden mit 150 ccm wässerigem Ammoniak, welches bei 0⁰ gesättigt ist, während 20 Stunden auf 150⁰ erhitzt. Da Glasröhren bei dieser Operation leicht springen, so haben wir starke Eisenrohre verwendet, nur muß man für sehr gute Dichtung sorgen. Da die Temperatur möglichst konstant gehalten werden soll, so diente zum Erhitzen der ammoniakalischen Lösung der empfehlenswerte, mit Petroleum gefüllte Röhrenofen von Volhard. Zum Schluß der Operation ist der Röhreninhalt eine honiggelbe, durch suspendierte Eisenverbindungen getrübte Flüssigkeit. Sie wird zunächst verdampft, am besten unter vermindertem Druck, um den größten Teil des Ammoniaks zu entfernen. Den Rückstand löst man in Wasser, filtriert und verdampft die Flüssigkeit abermals unter stark vermindertem Druck, bis das freie Ammoniak völlig entfernt ist. Der Verdampfungsrückstand ist schließlich ein dicker Sirup. Wenn die Operation gut verlaufen ist, darf eine

Probe, in Wasser gelöst, beim Übersättigen mit Salzsäure keine Sorbinsäure mehr abscheiden. Das Produkt enthält in großer Menge die zuvor erwähnte Diaminosäure. Um diese zu reinigen, löst man die Masse etwa in der siebenfachen Menge Wasser und versetzt mit einer ziemlich konzentrierten wässerigen Lösung von Phosphorwolframsäure, bis kein Niederschlag mehr erfolgt. Auf 10 g Sorbinsäure braucht man etwa 70 g Phosphorwolframsäure. Das gefällte Salz wird abgesaugt, scharf abgepreßt und diese Operation nach dem Anreiben mit Wasser wiederholt. Es ist selbst in heißem Wasser ziemlich schwer löslich und fällt beim Abkühlen in mikroskopisch kleinen Kristallwarzen aus. Die vom Phosphorwolframat abfiltrierte Flüssigkeit enthält nur wenig organische Substanz mehr (5—10% der angewandten Sorbinsäure), die sich nach Entfernung der Phosphorwolframsäure durch Baryt gewinnen läßt, die wir aber nicht mehr untersucht haben.

Das Phosphorwolframat wurde zuerst zur Reinigung fein gepulvert und 24 Stunden mit der 20-fachen Menge Wasser von Zimmertemperatur geschüttelt. Hierbei gehen ungefähr 10% in Lösung. Das Ungelöste wird nach dem Filtrieren in der 7—8-fachen Menge Wasser suspendiert und mit einer konz. heißen Lösung von überschüssigem Baryt (auf 1 Teil Phosphorwolframat ungefähr 1,3 Teile kristallisiertes Baryumhydroxyd) 1—2 Stunden auf dem Wasserbade unter häufigem Umrühren erwärmt. Schließlich läßt man erkalten, fällt aus der filtrierten Flüssigkeit den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure, kocht und verdampft die heiß filtrierte Lösung unter stark vermindertem Druck. Der amorphe Rückstand wird mit heißem Alkohol aufgenommen, wobei eine kleine Menge von Baryumverbindungen zurückbleibt.

Die alkoholische Flüssigkeit hinterläßt eine gelbliche gummiähnliche Masse, die stark alkalisch reagiert, und sich sehr leicht in Wasser und Alkohol löst. Die verdünnte wässerige Lösung wird durch Sublimat und Tannin gefällt. Die angesäuerte Lösung wird durch Phosphorwolframsäure, aber nicht durch Ferrocyanwasserstoff, Goldchlorid und Platinchlorid gefällt. Das einzige kristallisierte, einfache Salz, das wir bisher erhielten, ist das Pikrat.

Pikrat, $C_6H_{14}N_2O_2 + C_6H_3N_3O_7$. 3 g der gereinigten Diaminosäure wurden in 10 g Wasser gelöst, 3 g gepulverte reine Pikrinsäure zugegeben und bis zur völligen Lösung erhitzt. Beim Erkalten schied sich das Pikrat in schönen gelben Nadeln ab. Es wurde nach einstündigem Stehen abgesaugt, zwischen Papier gepreßt, dann mit kaltem Wasser angerieben und ebenso filtriert. Die Ausbeute betrug 4,5 g. Die Mutterlauge vom Pikrat gab wohl auf Zusatz von weiterer Pikrinsäure noch etwas Salz, aber in ziemlich unreiner Beschaffenheit. Das erst ausgefallene Pikrat wurde nach dem Trocknen mit Benzol ausgekocht, dann

nochmals aus heißem Wasser umkristallisiert und für die Analyse im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1751 g Sbst.: 0,2471 g CO_2, 0,0709 g H_2O. — 0,1388 g Sbst.: 22,2 ccm N (16⁰, 760 mm).

$C_{12}H_{17}N_5O_9$. Ber. C 38,4, H 4,5, N 18,7.
Gef. „ 38,5 „ 4,5, „ 18,7.

Das Salz schmolz beim langsamen Erhitzen bei 181—182⁰ (185,5 bis 186,5⁰ korr.) ohne Gasentwickelung zu einer hellroten Flüssigkeit, und der Schmelzpunkt blieb nach dem Umlösen derselbe.

Aminohexensäureanhydrid, C_6H_9ON.

Wie zuvor erwähnt, wird die Diaminosäure bei höherer Temperatur unter Verlust von Ammoniak und Wasser zersetzt. Diese Reaktion findet schon bei 150⁰ statt, erfordert aber dann zur Vollendung mehrere Stunden. Beim Erkalten erstarrt die Masse zum Teil kristallinisch, und es läßt sich daraus direkt durch Auskochen mit hochsiedendem Ligroïn das Aminohexensäureanhydrid isolieren. Leichter gelingt aber die Reinigung des letzteren durch Destillation unter vermindertem Druck. Für die praktische Darstellung des Anhydrids läßt sich die rohe Diaminosäure verwenden, und man verfährt zweckmäßig auf folgende Art.

Die bei dem Eindampfen der ammoniakalischen Lösung bleibende Diaminosäure wird mit möglichst wenig Alkohol in einen Fraktionierkolben mit weitem Ansatz gebracht. Der Alkohol wird verdampft und der Rückstand im Ölbade 2—3 Stunden auf 150⁰ erhitzt, bis die Entwickelung von Ammoniak sehr schwach geworden ist. Die Masse färbt sich dabei dunkler und erstarrt nach dem Abkühlen. Sie wird ohne weiteres bei 10—20 mm Druck destilliert. Das Destillat ist anfangs farblos und zum Schluß schwach rötlich gelb gefärbt.

Die Ausbeute betrug 28 g aus 35 g Sorbinsäure. Das zum größeren Teil feste Rohprodukt hat einen ziemlich starken, an Coniin erinnernden Geruch. Zur Isolierung des Anhydrids wird die Masse wiederholt mit hochsiedendem Ligroïn (Sdp. 90—120⁰) ausgekocht, wobei eine relativ kleine Menge einer gelblich braunen dicken Flüssigkeit zurückbleibt. Aus dem Ligroïn scheidet sich beim Erkalten das Anhydrid als fast farblose, kristallinische Masse ab. Die Ausbeute an diesem schon ziemlich reinen Produkt betrug $^1/_3$ der angewandten Sorbinsäure. Eine weitere, nicht unbeträchtliche Menge befindet sich in den Mutterlaugen, allerdings zunächst verunreinigt mit Sorbinsäure und anderen, nicht näher untersuchten Substanzen. Verdampft man das Ligroïn und löst den Rückstand in heißem Wasser, so kristallisiert beim Erkalten die

Sorbinsäure, und aus der Mutterlauge können durch Verdampfen, Destillation und Kristallisation noch mehrere Gramm des Anhydrids gewonnen werden. Das aus Ligroïn kristallisierende Präparat ist noch nicht ganz rein, wie man aus dem Schmelzpunkt ersehen kann. Die letzte Reinigung wurde deshalb durch Umlösen aus Äther bewerkstelligt. Man löst zu dem Zweck in etwa 40 Teilen kochenden Äthers und läßt verdunsten. Dabei scheiden sich ziemlich große, farblose und meist schief abgeschnittene Prismen ab, die bei 108° (109° korr.) schmelzen.

Für die Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1315 g Sbst.: 0,3118 g CO_2, 0,0961 g H_2O. — 0,1720 g Sbst.: 18,7 ccm N (19°, 763 mm).

C_6H_9ON. Ber. C 64,9, H 8,1, N 12,5.
Gef. „ 64,7, „ 8,1, „ 12,6.

Das Aminohexensäureanhydrid löst sich leicht in Wasser, Alkohol, Essigester, Benzol und Pyridin, erheblich schwerer in Äther und noch schwerer in kaltem, ziemlich leicht dagegen in heißem, hochsiedendem Ligroïn.

Die wässerige Lösung reagiert neutral und färbt sich beim kurzen Kochen mit Kupferoxyd nicht.

Phosphorwolframsäure erzeugt in der neutralen wässerigen Lösung einen amorphen, anfangs milchig aussehenden Niederschlag. In schwefelsaurer Lösung entsteht dagegen sofort ein fester Niederschlag, der unter dem Mikroskop körnig, aber nicht deutlich kristallinisch erscheint. Er löst sich in der heißen Mutterlauge und scheidet sich aus dieser beim Erkalten in mikroskopisch kleinen, ziemlich dicken, flächenreichen Kristallen ab.

Das Anhydrid ist gegen Basen ziemlich beständig, kurzes Aufkochen mit Barytwasser z. B. genügt nicht zu seiner Aufspaltung. Beim mehrstündigen Erhitzen mit überschüssigem Barytwasser auf dem Wasserbade wird es aber in eine Aminosäure verwandelt, die in Wasser und Alkohol leicht löslich ist und ein tiefblaues, ebenfalls in Wasser und in Methylalkohol lösliches Kupfersalz bildet. Diese Aminosäure, deren Kristallisation bis jetzt nicht gelungen ist, besitzt Ähnlichkeit mit der Pyrrolidincarbonsäure und ist vielleicht Methylpyrrolidincarbonsäure, deren Bildung aus δ-Aminohexensäure leicht zu erklären wäre. Jedenfalls verdient diese Beobachtung eine nähere Untersuchung.

Nach Versuchen des Herrn Dr. med. E. Abderhalden erzeugt das Aminohexensäureanhydrid in wässeriger Lösung subkutan bei Mäusen gesteigerte Reflexerregbarkeit, die sich bei einer Menge von

0,4 mg für 1 g Körpergewicht zu starkem Krampf steigert; bei 0,5 mg trat in der Regel nach 6—24 Stunden Tod ein.

Ähnlich der Sorbinsäure verhält sich ihr niederes Homologes, die von Doebner (diese Berichte 35, 1136 [1902]) beschriebene β-Vinylacrylsäure gegen Ammoniak bei 150°. Sie liefert nach den Versuchen von Dr. Raske auch eine Diaminosäure, und daraus entsteht gleichfalls bei der Destillation unter vermindertem Druck ein kristallisiertes Zersetzungsprodukt. Dagegen sind ähnliche Versuche von Dr. Pavirani mit der Cinnamylidenacrylsäure erfolglos geblieben.

---

16. Emil Fischer und Karl Raske: Verwandlung der β-Vinyl-acrylsäure in Diamino-valeriansäure.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 38, 3607 (1905).
(Eingegangen am 26. Oktober.)

Ähnlich der Sorbinsäure[1]) nimmt ihr niederes Homologe, die β-Vinylacrylsäure, bei höherer Temperatur 2 Mol. Ammoniak auf, und es entsteht eine stark alkalische Aminosäure, die nach Bildung, Eigenschaften und Analyse des Pikrats eine Diaminovaleriansäure ist. Von dem gleich zusammengesetzten inaktiven Ornithin scheint die Verbindung verschieden zu sein, denn wir haben die für jenes charakterische Dibenzoylverbindung nicht erhalten können. Andererseits müssen wir bemerken, daß die Einheitlichkeit des von uns erhaltenen neuen Körpers nicht gewährleistet ist, und daß ein etwaiger Gehalt an Ornithin sich der Beobachtung hätte entziehen können.

Bei der trocknen Destillation unter vermindertem Druck liefert die Diaminosäure gerade so wie das Homologe aus der Sorbinsäure unter Abspaltung von Ammoniak ein kristallinisches Produkt von der Formel C_5H_7NO, das wir als das Anhydrid einer Aminopentensäure betrachten. Leider war die Ausbeute so schlecht, daß wir nicht entscheiden konnten, ob es das Dihydroderivat des Pyridons oder ein ungesättigter Abkömmling des Pyrrolidons ist. Aus seiner Bildung kann man aber mit einiger Wahrscheinlichkeit schließen, daß in der Diaminovaleriansäure eine Aminogruppe in γ- oder in δ-Stellung steht.

Wenn wir diese Beobachtungen trotz der offenbaren Lückenhaftigkeit veröffentlichen, so geschieht es, weil wir bei der schwierigen Beschaffung der β-Vinylacrylsäure vorläufig nicht in der Lage sind, sie zu vervollständigen.

Darstellung der Diaminovaleriansäure.

10 g β-Vinylacrylsäure, die nach dem Verfahren von Döbner[2]) ganz frisch bereitet war, wurde mit 150° g bei 0 gesättigtem, wässerigem Ammoniak in einem dickwandigen, sehr sorgfältig verschraubten,

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 2357 [1904]. (*S. 237.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 35, 1136 [1902].

eisernen Rohr 20 Stunden im Volhardschen Petroleumofen auf 150° erhitzt. Die Reaktionsflüssigkeit war gelblich gefärbt und durch Eisenoxydflocken getrübt. Sie wurde unter vermindertem Druck verdampft, dann in Wasser gelöst, von den Eisenverbindungen abfiltriert und zur möglichst völligen Entfernung des Ammoniaks wieder unter vermindertem Druck stark eingedampft.

Die rohe Diaminovaleriansäure bildet einen dunkelbraunen Sirup, der in Wasser und Methylalkohol leicht, dagegen in Äthylalkohol ziemlich schwer löslich ist. Zur Reinigung dient am besten das schwer lösliche Phosphorwolframat. Für seine Gewinnung löst man die aus 10 g β-Vinylacrylsäure erhaltene Diaminoverbindung in 70 ccm Wasser und fügt eine konzentrierte Lösung von Phosphorwolframsäure hinzu, solange noch ein Niederschlag entsteht. Dazu sind ungefähr 85 g Phosphorwolframsäure nötig. Die in der Lösung verbleibende organische Substanz beträgt ungefähr 10% der angewandten β-Vinylacrylsäure. Sie läßt sich nach Entfernung der Phosphorwolframsäure durch Baryt und des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure als Sirup isolieren, ist aber nicht weiter untersucht worden.

Das gefällte Phosphorwolframat wird scharf abgesaugt, dann gepreßt, nochmals mit kaltem Wasser angerieben und das Absaugen und Pressen wiederholt.

Um jetzt noch beigemengte, leichter lösliche Produkte zu entfernen, haben wir den Niederschlag wiederum in der 20-fachen Menge Wasser suspendiert und 24 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt, wobei noch 10% in Lösung gingen. Da der Niederschlag durch diese Operation sehr feinpulverig geworden war, so wurde er erst durch Zentrifugieren und schließlich durch Absaugen und Pressen von der Flüssigkeit befreit.

Für die Gewinnung der freien Diaminosäure wurde das gereinigte Phosphorwolframat mit 700 g Wasser und 140 g kristallisiertem Barythydrat 4—5 Stunden unter häufigem Umrühren auf dem Wasserbade erhitzt, dann die filtrierte Lösung mit Kohlensäure gesättigt, nach dem Aufkochen filtriert, das Filtrat unter vermindertem Druck eingedampft und der Rückstand mit Methylalkohol aufgenommen. Beim Verdunsten der von den unlöslichen Baryumsalzen filtrierten, methylalkoholischen Lösung blieb die Diaminovaleriansäure als dunkelgelber Sirup zurück. Die Ausbeute betrug 70—80% der angewandten β-Vinylacrylsäure. Das Präparat kann noch sehr geringe Mengen Baryt enthalten, der durch genaue Fällung mit Schwefelsäure zu entfernen ist.

Die Kristallisation der Diaminosäure ist uns bisher nicht gelungen. Sie ist leicht löslich in Wasser und in Methylalkohol, schwer löslich in Äthylalkohol und unlöslich in Äther. Ihre wässerige Lösung reagiert

stark alkalisch und wird durch Quecksilberchlorid gefällt. Phosphorwolframsäure erzeugt sowohl in der wässerigen, wie in der schwefelsauren Lösung einen starken Niederschlag, der im ersten Fall recht voluminös, im zweiten Fall körnig und dichter ist. Die salzsaure Lösung der Diaminosäure gibt weder mit Gold-, noch mit Platinchlorid eine Fällung.

Pikrat. Die Salze der Diaminovaleriansäure mit den Mineralsäuren haben ebenso schlechte Eigenschaften wie die Base selbst. Schöner ist das Pikrat. Versetzt man die nicht zu verdünnte Lösung der Base mit Pikrinsäure, so bildet sich beim Erwärmen eine dunkelgelbe, klare Lösung, und beim Erkalten fällt ein braunes Öl aus, das erst beim längeren Reiben unter gleichzeitiger starker Abkühlung zu einem gelben, kristallinischen Pulver erstarrt. Es löst sich in Wasser mit dunkelgelber Färbung und fällt beim Erkalten zunächst wieder als Öl aus, das aber allmählich erstarrt. Je nach der Darstellung haben wir nun für dieses Pikrat verschiedene Zahlen gefunden, von denen die einen auf ein Dipikrat, die anderen auf ein Monopikrat stimmen.

Das erste wurde merkwürdigerweise erhalten, als die Menge der angewandten Pikrinsäure noch nicht ganz 1 Mol. entsprach. Es wurden nämlich 2,5 g der sirupösen Diaminosäure mit der gleichen Menge Pikrinsäure in 10 ccm heißem Wasser gelöst. Die Ausbeute an kristallinischem Pikrat betrug 2,8 g. Nachdem das Präparat noch zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet war, schmolz es bei 185° (korr.), und dieser Schmelzpunkt änderte sich nicht beim weiteren Umlösen.

0,1830 g Sbst.: 0,2345 g CO_2, 0,0537 g H_2O. — 0,1333 g Sbst.: 0,1695 g CO_2, 0,0409 g H_2O. — 0,1394 g Sbst.: 23,4 ccm N (22°, 765 mm).

$C_5H_{12}N_2O_2(C_6H_3N_3O_7)_2$ (Mol.-Gew. 590).

	C	H	N
Ber.	34,58,	3,05,	18,98.
Gef.	34,95, 34,68,	3,28, 3,43,	19,30.

Beim zweiten Versuch wurde, um die Ausbeute zu erhöhen, die Menge der Pikrinsäure größer gewählt, also 2 g Diaminosäure mit 4 g Pikrinsäure in 10 ccm Wasser gelöst. Die Ausbeute des kristallinischen Produktes betrug dann zunächst 5,2 g. Um sicher zu sein, daß keine überschüssige Pikrinsäure dem Salz beigemengt sei, haben wir das Präparat jetzt wiederholt mit Benzol ausgekocht, wobei die Ausbeute auf 3,4 g zurückging.

Dies Produkt zeigte nun keinen bestimmten Schmelzpunkt, denn es begann schon bei 130° sich aufzublähen und schmolz vollständig zwischen 160° und 170° zu einer dunkelgelben Flüssigkeit. Die Analyse gab hier Zahlen, die am besten auf ein Monopikrat stimmen.

0,1733 g Sbst.: 0,2329 g CO_2, 0,0617 g H_2O. — 0,1566 g Sbst.: 0,2121 g CO_2, 0,0557 g H_2O. — 0,1545 g Sbst.: 26 ccm N (21°, 758 mm).

$C_5H_{12}N_2O_2 . C_6H_3N_3O_7$ (Mol.-Gew. 361).

Ber. C 36,56, H 4,15, N 19,39.
Gef. „ 36,65, 36,94, „ 3,95, 3,95, „ 19,20.

Wir bemerken dazu, daß die beiden Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmungen mit Präparaten verschiedener Darstellung ausgeführt sind. Vorausgesetzt, daß die ursprüngliche Diaminosäure ein einheitliches Präparat ist, würden also zwei Pikrate existieren, und wir glauben, hier darauf aufmerksam machen zu sollen, daß Schulze und Winterstein[1]) die gleiche Möglichkeit für das Ornithin annehmen. Andererseits aber müssen wir hier nochmals darauf hinweisen, daß unsere Diaminosäure auch ein Gemisch verschiedener Isomeren sein kann; denn die eben beschriebenen Pikrate sind nicht schön genug, um sicher als einheitliche Stoffe betrachtet zu werden.

Aminopentensäureanhydrid, C_5H_7NO.

Wie schon erwähnt, wird die Diaminovaleriansäure bei höherer Temperatur unter Abspaltung von Wasser und Ammoniak zersetzt. Bei der Destillation unter stark vermindertem Druck geht dann eine hellgelbe, zum Schluß dunkel gefärbte, dicke Flüssigkeit in die Vorlage über, welche nach einiger Zeit kristallinisch erstarrt.

Man kann zu diesem Versuch die rohe Diaminosäure verwenden und verfährt am zweckmäßigsten auf folgende Art: Die beim Eindampfen der ammoniakalischen Lösung bleibende Diaminosäure wird mit wenig Wasser oder noch besser Methylalkohol in ein Fraktionierkölbchen gebracht, die Flüssigkeit verdampft und der Rückstand im Ölbad 2 bis 3 Stunden auf 150° erhitzt, bis die Ammoniakentwickelung sehr schwach geworden ist. Die dunkel gefärbte Masse, welche beim Abkühlen erstarrt, wird dann ohne weiteres bei möglichst geringem Druck (am besten unter 1 mm) destilliert. Das Destillat ist anfangs fast farblos, wird zum Schluß dunkelbraun und erstarrt meist nach 1—2 Stunden kristallinisch. Die Ausbeute betrug ca. 5 g aus 10 g β-Vinylacrylsäure. Seine wässerige Lösung reagierte sauer und wurde deshalb bei 40—50° mit Calciumcarbonat neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingedampft. Von diesem Rückstand blieben bei wiederholtem Auskochen mit hochsiedendem (100—120°) Ligroïn ca. 0,5 g als dunkelbraune, ölige Masse zurück, so daß 4,5 g in Lösung gegangen waren. Diese schieden sich beim starken Abkühlen als farblose, derbe, nadelförmige Kristalle ab, waren aber noch stark verunreinigt durch ölige Beimischungen. Aus der Mutter-

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. **34**, 128.

lauge ließen sich nur noch geringe Mengen erhalten. Um die öligen Teile zu entfernen, haben wir die Kristalle zwischen Fließpapier abgepreßt. Da der Schmelzpunkt ein ziemlich niedriger ist und durch die Verunreinigungen noch herabgesetzt wird, war es bei Sommertemperatur notwendig, die Porzellanplatten der Presse vorher durch eine Kältemischung zu kühlen; doch auch dann traten noch sehr erhebliche Verluste ein und die Ausbeute schwankte bei den einzelnen Versuchen zwischen 0,9 und 1,1 g aus 10 g β-Vinylacrylsäure.

Zur völligen Reinigung wurde die Substanz in wasserfreiem, warmem Äther gelöst, mit wenig frisch destilliertem Ligroïn (Sdp. 65—80°) versetzt, der Äther verdunstet und die Kristallisation durch Einstellen in eine Kältemischung vervollständigt.

So dargestellt, bildet das Aminopentensäureanhydrid farblose, derbe Nadeln vom Schmp. 51—53° (korr.); leicht löslich in Wasser, Äthylalkohol, Essigester, Benzol, Pyridin, schwerer in Äther und recht schwer in kaltem Ligroïn. Die wässerige Lösung reagiert auf Lakmus ganz schwach sauer.

Für die Analyse wurde im Vakuum zuerst über Paraffin, dann über Schwefelsäure getrocknet.

0,1787 g Sbst.: 0,4041 g CO_2, 0,1187 g H_2O. — 0,1392 g Sbst.: 17,7 ccm N (25°, 755 mm).

C_5H_7NO (Mol.-Gew. 97). Ber. C 61,85, H 7,22, N 14,44.
Gef. „ 61,68, „ 7,38, „ 14,18.

Die Verbindung ist dem aus Sorbinsäure gewonnenen Aminohexensäureanhydrid[1]) sehr ähnlich. Sie wird ebenso wie jenes durch Kochen mit Basen in eine Verbindung vom Charakter der Aminosäuren verwandelt.

Zu dem Zweck wurden 0,5 g mit 5 g Wasser und 2,5 g kristallisiertem Baryumhydroxyd im silbernen Rohr 4 Stunden auf 100° erhitzt, dann der Baryt durch Kohlensäure gefällt, nach dem Aufkochen filtriert und die Lösung zur Trockne verdampft. Der Rückstand war ein schwach gelber Sirup, der sich leicht in Wasser, aber fast gar nicht in absolutem Alkohol löste und dessen wässerige Lösung Kupferoxyd beim Kochen mit tiefblauer Farbe aufnahm.

Über die Zusammensetzung und Struktur dieser Aminosäure können wir keine Angaben machen, da Materialmangel ihre ausführliche Untersuchung verhindert hat. Jedenfalls ist sie aber verschieden von der α-Pyrrolidincarbonsäure. Das verdient hervorgehoben zu werden, da die analoge, aus Aminohexensäureanhydrid durch Aufspalten mit Baryt erhaltene Substanz eine gewisse Ähnlichkeit mit der Pyrrolidincarbonsäure zu haben schien, die aber wohl nur zufällig gewesen ist.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2357 [1904]. (*S. 240.*)

17. Emil Fischer und Hermann Leuchs: Synthese des Serins, der *l*-Glucosaminsäure und anderer Oxyaminosäuren[1]).

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **35**, 3787 (1902).
(Eingegangen am 28. Oktober.)

Obschon das im Jahre 1865 von Cramer[2]) unter den Spaltungsprodukten des Seidenleims entdeckte Serin als die erste und einfachste Oxyaminosäure der aliphatischen Reihe sowohl in chemischer wie in physiologischer Hinsicht ein erhöhtes Interesse bietet, ist doch bisher sein Studium so lückenhaft geblieben, daß selbst über die Struktur noch Zweifel bestehen. Zwar weiß man aus der schon vom Entdecker beobachteten Umwandlung in Glycerinsäure, daß es eine Aminomilchsäure sein muß, aber die Stellung der Aminogruppe blieb unbestimmt. In manchen Lehrbüchern findet man es allerdings als α-Amino-β-oxypropionsäure angeführt; allein der einzige Grund, der für diese Auffassung geltend gemacht werden kann, ist die Verschiedenheit des Serins vom sogenannten Isoserin.

Dieses wurde zuerst von Melikow[3]) aus α-Chlormilchsäureester und später von Erlenmeyer[4]) aus β-Chlormilchsäure, sowie von beiden Forschern[5]) aus Glycidsäure dargestellt, die wahrscheinlich auch bei der Verwendung der Chlormilchsäuren als Zwischenprodukt entsteht. Obgleich beide Autoren zu der Ansicht neigen, daß beim Isoserin die Aminogruppe sich in der β-Stellung befinde, so fehlt doch dafür der direkte Beweis. Denn die Annahme Melikows, daß die Addition des Ammoniaks an Glycidsäure ebenso erfolge wie die der Salzsäure, kann nur als eine wahrscheinliche Hypothese angesehen werden.

---

[1]) Diese Mitteilung ist eine Erweiterung der Abhandlung über Serin und Isoserin, welche wir am 30. Januar d. J. der Berliner Akademie der Wissenschaften vorlegten. Siehe Sitzungsberichte 1902, 78. Vgl. auch Chem. Centralblatt **1902**, I, 762.

[2]) Journ. für prakt. Chem. **96**, 76.

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **12**, 2227 [1879].

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **13**, 1077 [1880].

[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **13**, 958, 1260 [1880].

Schließlich war auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß das Serin als Abkömmling eines Proteïnstoffes die optisch-aktive Form des racemischen Isoserins sei. Denn wenn auch Baumann[1]) beim Serin keine Drehung des polarisierten Lichts beobachten konnte, so weiß man von anderen Aminosäuren, z. B. Alanin[2]), daß das Drehungsvermögen der aktiven Form sehr gering sein und dadurch der Beobachtung entgehen kann.

Alle diese Zweifel ließen uns eine neue Untersuchung der beiden Oxyaminosäuren wünschenswert erscheinen. Wir haben für die Entscheidung der Strukturfrage den synthetischen Weg gewählt, und es gelang uns, durch Einwirkung von Ammoniak und Blausäure auf Glykolaldehyd ein Produkt zu erhalten, welches in der Tat mit dem Serin aus Seidenleim identisch ist. Wenn schon aus dieser Synthese für das Serin mit großer Wahrscheinlichkeit die Strukturformel

$$CH_2(OH).CH(NH_2).COOH$$

(α-Amino-β-oxypropionsäure) folgt, so wird dieselbe außer Zweifel gestellt durch die Reduktion der Verbindung mit Jodwasserstoff zu gewöhnlichem Alanin.

Da das Isoserin unter den gleichen Bedingungen in β-Aminopropionsäure verwandelt wird, so ist damit auch der endgültige Beweis für die schon bisher übliche Strukturformel des Isoserins

$$CH_2(NH_2).CH(OH).CO_2H$$

gegeben.

Die Synthese des Serins ist unseres Wissens die erste Anwendung der allgemeinen Streckerschen Methode zum Aufbau von α-Aminosäuren auf Oxyaldehyde der aliphatischen Reihe. Daß die Reaktion auch für die β-Oxyaldehyde gilt, zeigte das Verhalten des Aldols, aus dem wir die α-Amino-γ-oxyvaleriansäure,

$$CH_3.CH(OH).CH_2.CH(NH_2).COOH,$$

erhielten.

Ähnlich den gewöhnlichen γ-Oxysäuren geht sie leicht in ein Anhydrid über, welches wohl als das Lacton

$$CH_3.\underset{\lfloor O \text{———————} \rfloor}{CH.CH_2.CH(NH_2).CO}$$

aufzufassen ist. Letzteres zeigt eine merkwürdige Polymerisation; denn es verwandelt sich schon bei gewöhnlicher Temperatur in eine feste

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **15**, 1735 [1882].

[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2453 [1899]. (*S. 89.*)

Substanz, welche die gleiche empirische Zusammensetzung, aber das doppelte Molekulargewicht hat, und die wir glauben, als das Diacipiperazin,

$$\begin{array}{c} \qquad\qquad\qquad\qquad NH \\ CH_3.CH(OH).CH_2.CH\langle\ \rangle CO \\ \qquad\qquad\qquad\qquad CO\langle\ \rangle CH.CH_2.CH(OH).CH_3 \\ \qquad\qquad\qquad\qquad NH \end{array}$$

betrachten zu müssen.

Endlich ist es uns gelungen, das Verfahren auf einige Zucker zu übertragen, indem wir die von Lobry de Bruyn und van Leent[1]) beschriebenen Ammoniakverbindungen als Ausgangsmaterial benutzten. So gab die Galaktose eine Aminosäure, $CH_2(OH).CH(OH).CH(OH).CH(OH).CH(OH).CH(NH_2).CO_2H$, die wir als Derivat der Galaheptose betrachten und deshalb Galaheptosaminsäure nennen.

Noch interessanter gestaltete sich das Resultat bei der *l*-Arabinose, denn die hier gewonnene Aminosäure, $CH_2(OH).CH(OH).CH(OH).CH(OH).CH(NH_2).CO_2H$, erwies sich als der optische Antipode der sogenannten Chitaminsäure, welche durch Oxydation des Glucosamins von Ledderhose mit Brom entsteht[2]). Durch diese Beobachtung wird die Frage nach der Konstitution des Glucosamins der Lösung zugeführt. Die Konfiguration der aus *l*-Arabinose entstehenden Aminosäure, welche selbstverständlich die Aminogruppe in der α-Stellung enthält, ist bis auf das dem Carboxyl benachbarte Kohlenstoffatom durch die Synthese bestimmt, mit anderen Worten, die Säure entspricht entweder der *l*-Gluconsäure oder der *l*-Mannonsäure, und das natürliche Glucosamin ist mithin das Analogon der *d*-Glucose oder der *d*-Mannose.

Diese Erkenntnis macht eine Veränderung der Nomenklatur notwendig. Tiemann und der eine von uns haben die aus dem Glucosamin entstehende Säure Chitaminsäure genannt, weil sie auf Grund der Umwandlungen, welche sie durch salpeterige Säure erfährt, glaubten, ihr eine andere Konfiguration als dem Traubenzucker oder der Mannose zuschreiben zu müssen.

Aus demselben Grunde ist von anderen Autoren der Name Glucosamin in Chitosamin abgeändert worden. Diese Worte sind jetzt überflüssig; der alte von Ledderhose gewählte Name Glucosamin verdient in jeder Beziehung rehabilitiert zu werden, und wir wählen für die entsprechende Säure den Namen Glucosaminsäure. Selbstverständlich ist es nötig, eine *d*- und *l*-Form zu unterscheiden, und wir gebrauchen die

---

[1]) Rec. Trav. chim. Pays-Bas **14**, 140 u. 145.

[2]) E. Fischer u. Tiemann, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **27**, 142 [1894].

Bezeichnung *l*-Glucosaminsäure für das aus *l*-Arabinose synthetisch erhaltene Produkt.

Leider hat Herr Lobry de Bruyn den Namen Glucosamin auch für den Körper gebraucht, welcher aus *d*-Glucose und Ammoniak unter Wasserabspaltung entsteht, obschon er zweifellos anders konstituiert ist als das Glucosamin Ledderhose's und das von E. Fischer synthetisch bereitete Isoglucosamin bzw. Acrosamin. Diese Schwierigkeit läßt sich beseitigen, wenn man die an sich ganz richtig gebildete Bezeichnung Lobry de Bruyns in Glucosimin abändert und analoge Namen für alle ähnlichen Verbindungen der Zucker mit Ammoniak einführt.

Die früher unter dem Namen Chitose, Chitonsäure und Chitarsäure beschriebenen Substanzen sind vom Glucosamin und der Glucosaminsäure, aus denen sie durch die Einwirkung der salpetrigen Säure gebildet werden, weiter entfernt als man früher annehmen konnte. Ihre Bildung ist offenbar ein anomaler Vorgang, der noch der Aufklärung bedarf, und es liegt vorläufig kein Grund vor, die obigen Namen, die an den Ursprung aus Chitin erinnern, zu verändern.

Die künstliche Gewinnung der Glucosaminsäure legte selbstverständlich den Gedanken nahe, die Synthese bis zur Bildung der Glucosamine fortzuführen. Das ist uns in der Tat auf folgende Weise gelungen: Behandelt man die Glucosaminsäuren mit Alkohol und Salzsäure, so entstehen Produkte, die wir zwar noch nicht analysiert haben, die wir aber für Lactone halten, und diese lassen sich ähnlich den gewöhnlichen Lactonen der Zuckergruppe mit Natriumamalgam reduzieren. Wir haben den Vorgang bei der *d*-Glucosaminsäure genauer untersucht und uns überzeugt, daß dabei das gewöhnliche *d*-Glucosamin entsteht. Für die totale Synthese des letzteren ist also nur noch nötig, die *d*-Arabinose mit Ammoniak und Blausäure in *d*-Glucosaminsäure überzuführen. Obschon an dem Gelingen des Versuches nicht gezweifelt werden kann, so werden wir ihn doch noch ausführen und dann in einer besonderen Mitteilung die Synthese des physiologisch so interessanten *d*-Glucosamins beschreiben.

Synthese des Serins.

Der zuerst aus Bromacetaldehyd erhaltene Glykolaldehyd[1]) wird bekanntlich am bequemsten nach dem Verfahren von Fenton aus Dioxymaleïnsäure dargestellt[2]). Für den vorliegenden Zweck ist die Isolierung des reinen Aldehyds nicht nötig, man bedarf aber einer alkoholischen Lösung. Wir verfuhren deshalb folgendermaßen: 40 g Di-

---

[1]) E. Fischer u. Landsteiner, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **25**, 2552 [1892].
[2]) Journ. Chem. Soc. **75**, 575.

oxymaleïnsäure werden nach Fenton mit 100 ccm Wasser etwa $^1/_2$ Std. auf 60—70° erwärmt, bis die Kohlensäureentwickelung aufhört, dann die Lösung unter stark vermindertem Druck bei etwa 40° verdampft, zuletzt mit absolutem Alkohol vermischt und nochmals verdampft, um das Wasser möglichst zu entfernen. Den zurückbleibenden Glykolaldehyd löst man in 40 ccm Alkohol, läßt 2 Tage stehen, fügt dann die für 1 Molekül berechnete Menge alkoholisches Ammoniak (33 ccm der bei 0° gesättigten Lösung) hinzu, läßt wieder einen Tag stehen und versetzt mit der berechneten Menge Blausäure, d. i. 9 ccm der wasserfreien Säure. Die vorher schwach gelb gefärbte Lösung färbt sich jetzt allmählich rotbraun. Nachdem sie 24 Stunden gestanden hat, fügt man das gleiche Volumen wässeriger Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) hinzu und sättigt nach weiteren 24 Stunden die Flüssigkeit unter Eiskühlung mit gasförmiger Salzsäure. Dabei vermehrt sich die Menge des schon zuvor abgeschiedenen Chlorammoniums beträchtlich. Dasselbe wird filtriert und die salzsaure Mutterlauge unter stark vermindertem Druck bis zum Sirup verdampft. Um aus dem Rückstand Ammoniak und Chlor zu entfernen, haben wir ihn in etwa $^3/_4$ Liter Wasser gelöst und 4 bis 5 Stunden mit überschüssigem gewöhnlichen Bleioxyd gekocht, bis eine Probe der Lösung nur noch Spuren von Chlor enthielt. Bei dem Kochen tritt namentlich zum Schluß ein eigentümlicher Geruch auf, welcher an Fleischextrakt erinnert, und es liegt die Vermutung nahe, daß bei dieser Operation ein Teil des Serins zerstört wird. Wir haben aber bisher kein anderes Mittel für seine Isolierung gefunden. Die filtrierte Flüssigkeit wird nun mit Schwefelwasserstoff gefällt, die Mutterlauge unter vermindertem Druck stark eingedampft und mit absolutem Alkohol gefällt. Dadurch wird das Serin als schwach bräunlich gefärbte, kristallinische Masse abgeschieden. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug bei verschiedenen Versuchen ungefähr 2 g, das entspricht 9% der Theorie.

Ob der große Verlust durch schlechten Verlauf der Synthese oder teilweise auch durch die Umständlichkeit der Isolierungsmethode bedingt ist, lassen wir dahingestellt.

Das Rohprodukt wird in 5—6 ccm heißem Wasser gelöst, mit wenig Tierkohle bis zur Entfärbung gekocht und das Filtrat wieder mit absolutem Alkohol gefällt. Man erhält so ungefähr 1,5 g eines farblosen Präparates. Zur völligen Reinigung wird es aus 3—4 Teilen siedenden Wassers umkristallisiert. Für die Analyse war es im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1984 g Sbst.: 0,2483 g CO_2, 0,1198 g H_2O. — 0,1812 g Sbst.: 20,2 ccm N (16°, 770 mm).

$C_3H_7O_3N$. Ber. C 34,26, H 6,73, N 13,32.
Gef. „ 34,13, „ 6,77, „ 13,18.

Das Präparat bräunte sich beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 225° und schmolz unter Gasentwickelung gegen 240° (korr. 246°). Ebenso verhielt sich ein natürliches Serin, welches Dr. Skita aus Seidenleim dargestellt hatte. Die Löslichkeit des synthetischen Produktes in Wasser von 20° wurde gefunden 1 : 23,1, wobei die Lösung durch 5-stündiges Schütteln der fein gepulverten Substanz mit Wasser im Thermostaten hergestellt war. Für das natürliche Serin gibt Cramer die Löslichkeit 1 : 24,2 an. Der Geschmack war bei beiden Präparaten süß, während das Isoserin so gut wie geschmacklos ist. Auch im Aussehen der Kristalle war keinerlei Verschiedenheit zu erkennen. Aus wässeriger Lösung schieden sich sehr dünne Blättchen von unregelmäßiger Gestalt ab, die meist zu komplizierten Aggregaten verwachsen waren. Wir erwähnen ferner, daß nach der Beobachtung von E. Fischer und A. Skita[1]) das natürliche Serin nicht nur in wässeriger Lösung, wie schon Baumann[2]) angiebt, sondern auch in salzsaurer Lösung optisch völlig inaktiv ist.

Zum Vergleich haben wir noch die Verbindung mit Phenylcyanat herangezogen.

Phenylcyanat-Serin.

1 g der Aminosäure wird in 10 ccm Normal-Natronlauge und 5 ccm Wasser gelöst und nach dem Abkühlen auf 0° unter starkem Schütteln tropfenweise im Laufe von etwa $^3/_4$ Stunden mit 1,15 g Phenylcyanat versetzt. Der Geruch des letzteren verschwindet ziemlich rasch, und beim Übersättigen mit Salzsäure fällt der größte Teil der neuen Verbindung als weiße, voluminöse Masse aus. Läßt man Flüssigkeit samt Niederschlag im Vakuumexsikkator auf die Hälfte eindunsten, so ist die Abscheidung so vollständig, daß die Ausbeute nahezu quantitativ wird. Der Schmelzpunkt des Rohproduktes lag bei 158—159°, stieg aber bei 3—4 maligem Umkristallisieren aus heißem Wasser auf 165—166° (korr. 168—169°). Das Präparat gab nach dem Trocknen über Schwefelsäure folgende Zahlen:

0,1375 g Sbst.: 0,2710 g CO_2, 0,0670 g H_2O. — 0,1656 g Sbst.: 17,7 ccm N (17,5°, 774 mm).

$C_{10}H_{12}O_4N_2$. Ber. C 53,54, H 5,41, N 12,49.
Gef. „ 53,75, „ 5,46, „ 12,61.

Die Verbindung kristallisiert aus Wasser in feinen, meist sternförmig vereinigten Nadeln. Sie löst sich darin in der Hitze sehr leicht

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 226 [1902]. (*S. 690.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **15**, 1735 [1882].

und wird auch bei gewöhnlicher Temperatur von reinem Wasser in
erheblicher Menge aufgenommen, daß beim Umkristallisieren aus
8-fachen Menge beträchtliche Verluste entstehen. Viel schwerer lösl
ist sie bei Gegenwart von Kochsalz. In Alkohol ist sie noch viel leich
löslich als in Wasser.

Ein Präparat, welches aus natürlichem Serin auf die gleiche
dargestellt war, zeigte dieselben Eigenschaften[1]).

Verwandlung des Serins in α-Alanin.

1 g Serin wurde mit 10 ccm Jodwasserstoffsäure (spez. Gewic
1,96) und 0,3 g rotem Phosphor[2]) im Einschlußrohr 5 Stunden
120—125° erhitzt, dann die farblose Lösung mit Wasser auf 300 c
verdünnt, der Jodwasserstoff durch Kochen mit Bleioxyd entfernt u
das Filtrat nach dem Fällen mit Schwefelwasserstoff auf dem Wass
bade verdampft. Dabei blieb das Alanin als fast farblose Kristallma
zurück. Die Ausbeute betrug 0,8 g oder fast 95% der Theorie. Es wur
in wenig Wasser gelöst und durch Alkohol wieder ausgefällt; es schm
dann gleichzeitig mit einer Probe reinen Alanins beim raschen Erhitz
gegen 285° (korr. 295°) unter Gasentwickelung.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 226.

[2]) Der Überschuß von Phosphor, den man bei solchen Reduktionen an
wenden pflegt, verschwindet in der Regel vollständig, weil er unter dem Einfl
des Jodwasserstoffs teils oxydiert, teils reduziert wird. Oppenheim hat sch
im Jahre 1864 festgestellt (Bull. soc. chim. [I] **2**, 163), daß beim 2-stündigen
hitzen von amorphem Phosphor und konzentriertem Jodwasserstoff im geschl
senen Rohr auf 160° phosphorige Säure und Jodphosphonium entstehen.
war trotzdem einigermaßen überrascht durch die Beobachtung, daß diese Rea
tion schon bei 100° ziemlich rasch und recht glatt verläuft.

Als 3 g amorpher Phosphor mit 10 ccm rauchender Jodwasserstoffsä
vom spez. Gewicht 1,96 im geschlossenen Rohr 12 Stunden auf 100° erhitzt wurd
verschwand der Phosphor vollständig, und die Menge des in schönen Kristall
abgeschiedenen Jodphosphoniums betrug nach dem Erkalten ungefähr 8 g.
die Flüssigkeit sowohl phosphorige Säure wie Phosphorsäure enthielt, so hat m
bei der Erklärung des Vorganges die folgenden beiden Gleichungen zu berüc
sichtigen:

$$2\,P + 3\,H_2O = PO_3H_3 + PH_3$$
$$8\,P + 12\,H_2O = 3\,PO_4H_3 + 5\,PH_3.$$

Nach der ersten würde die theoretische Menge an Jodphosphonium aus
Phosphor 7,7 g, nach der zweiten 9,8 g betragen.

Als der gleiche Versuch mit der Abänderung wiederholt wurde, daß
Rohr dauernd geschüttelt wurde, war der Phosphor schon nach 4 Stunden völ
verbraucht.

Fischer.

Zur weiteren Charakterisierung wurde es mit Phenylcyanat in der bekannten Weise kombiniert. Die so erhaltene Phenylureïdosäure zeigte den von Kühn[1]) angegebenen Schmp. 170° (korr. 173°) und gab folgende Zahlen:

0,1972 g Sbst.: 0,4179 g CO_2, 0,1004 g H_2O.

$C_{10}H_{12}O_3N_2$. Ber. C 57,66, H 5,82.
Gef. „ 57,79, „ 5,71.

Derselbe Versuch, mit natürlichem Serin ausgeführt, gab das gleiche Resultat.

Isoserin (β-Amino-α-oxy-propionsäure).

Die Verbindung wird am bequemsten aus β-Chlormilchsäure bereitet. Zur Darstellung der letzteren benutzten wir das Verfahren V. von Richter's[2]).

Wir ließen 100 g Epichlorhydrin in 350 g Salpetersäure (spez. Gewicht 1,38), welche mit Eis gekühlt war, im Laufe von 10 Minuten einfließen. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbade erwärmt, wobei eine lebhafte Reaktion eintrat, die nach etwa 10 Minuten beendet war. Es wurde noch 20—30 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt, die erkaltete Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Wasser vermischt und achtmal mit je $^1/_4$ L Äther ausgezogen. Die vereinigten ätherischen Auszüge wurden verdampft und der Rückstand bei 20 mm Druck so lange auf 50—60° erhitzt, bis das Wasser und die Salpetersäure möglichst entfernt waren. Der zurückbleibende Sirup erstarrte bald kristallinisch und wurde durch Abpressen auf porösem Ton von der Mutterlauge völlig befreit. Die Ausbeute betrug etwa 50% des angewandten Epichlorhydrins.

Zur Verwandlung in die Aminoverbindung erhitzten wir 50 g der Chlormilchsäure, deren weitere Reinigung nicht nötig ist, mit 500 g Ammoniak von 23% im eisernen Autoklaven 4 Stunden auf 130°. Wir verdampften dann das überschüssige Ammoniak, lösten den Rückstand in 2 L Wasser und kochten mit gewöhnlichem Bleioxyd, bis das Ammoniak verschwunden und die Lösung fast chlorfrei geworden war. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff gefällt und die Mutterlauge bis zur Kristallisation verdampft. Die kaum gefärbten Kristalle wurden nach mehrstündigem Stehen bei 0° filtriert und durch einmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle gereinigt. Bei Anwendung von reiner Chlormilchsäure beträgt die Ausbeute an reinem Isoserin 70% der Theorie, bei Verwendung der unreinen Säure

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 2884 [1884].
[2]) Journ. für prakt. Chem. [2] **20**, 193 [1879].

war sie etwas geringer. Die Reinheit des Isoserins wurde durch die Analyse kontrolliert.

0,1757 g Sbst.: 0,2196 g CO_2, 0,1062 g H_2O. — 0,1910 g Sbst.: 22,4 ccm N (22⁰, 757 mm).

$C_3H_7O_3N$. Ber. C 34,26, H 6,73, N 13,32.
Gef. „ 34,09, „ 6,78, „ 13,24.

Den älteren Angaben über das Isoserin haben wir folgendes zuzufügen. Beim Erhitzen im Kapillarrohr verhält es sich ähnlich dem Serin. Es färbt sich beim raschen Erwärmen gegen 238⁰ braun und schmilzt gegen 242⁰ (korr. 248⁰) unter Zersetzung. Im Gegensatz zu dem süßen Serin ist es fast geschmacklos.

Das Kupfersalz, auf die gewöhnliche Art dargestellt, ist in heißem Wasser sehr leicht löslich und scheidet sich bei genügender Konzentration in der Kälte in dunkelblauen Nadeln ab. Diese haben die ungewöhnliche Zusammensetzung $C_3H_5O_3NCu + 3\,H_2O$. Das Kristallwasser entweicht zum allergrößten Teil (20,76%) bei 110⁰; der Rest ging vollständig erst bei 170⁰ fort (3,83%).

0,3375 g Sbst. verloren bei 170⁰ 0,0830 g H_2O und gaben 0,1216 g CuO.

$C_3H_5O_3NCu + 3\,H_2O$. Ber. H_2O 24,50, Cu 28,82.
Gef. „ 24,59, „ 28,79.

Die naheliegende Vermutung, daß hier ein basisches Salz vorliege, wird unwahrscheinlich durch die Beobachtung, daß das Salz durch Vermischen mit mehr Isoserin in wässeriger Lösung nicht verändert wird. Wir halten es demnach für wahrscheinlich, daß die Alkoholgruppe des Isoserins bei der Fixierung des Kupfers beteiligt ist, wie man es bekanntlich bei den komplexen Kupfersalzen der Weinsäure schon lange annimmt.

Beachtenswert ist das abweichende Verhalten des Serins, welches ein einfaches Kupfersalz bildet.

Da das Isoserin die am leichtesten zugängliche Aminooxysäure ist, haben wir es benutzt, um die Frage zu prüfen, ob sich bei diesen Säuren die Ester ebenso leicht isolieren lassen wie bei den Aminosäuren.

2 g gepulvertes Isoserin wurden mit 10 ccm absolutem Alkohol übergossen, Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet und auf dem Wasserbade erwärmt, wobei klare Lösung eintrat. Die Flüssigkeit wurde unter stark vermindertem Druck bei 35⁰ abgedampft und zur Vervollständigung der Esterifizierung die ganze Operation wiederholt. Beim abermaligen Abdampfen im Vakuum blieb der salzsaure Isoserinester als farbloser Sirup zurück. Er wurde mit Äther überschichtet, mit einer höchst konzentrierten Lösung von Kaliumcarbonat allmählich unter

Abkühlen und Umschütteln im Überschuß versetzt und der Äther öfters erneuert. Beim Abdampfen blieb der Ester des Isoserins als dicke Flüssigkeit von schwach basischem Geruch zurück, die in der Kälte zu einer Masse kaum gefärbter Kristalle erstarrte. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 40% der Theorie. Während der Ester bei 8 mm Druck nicht destilliert werden konnte, gelang die Sublimation bei 0,25 mm Druck aus einem Bade, dessen Temperatur 95° betrug. Allerdings wurde dabei ein erheblicher Teil des Esters unter Abspaltung von Alkohol zersetzt. Das sublimierte Produkt bildete farblose, kurze Nadeln, die in Äther schwer löslich sind; es schmilzt bei 75—76°; die wässerige Lösung reagiert basisch.

0,1940 g Sbst.: 0,3189 g CO_2, 0,1408 g H_2O. — 0,2695 g Sbst.: 24,4 ccm N (17°, 765 mm).

$C_5H_{11}O_3N$. Ber. C 45,08, H 8,34, N 10,52.
Gef. „ 44,83, „ 8,10, „ 10,57.

Phenylcyanat-Isoserin, $C_6H_5.NH.CO.NH.CH_2.CH(OH).CO_2H$.

Die Darstellung der Verbindung ist genau dieselbe wie beim Serin. Die Ausbeute betrug 85% der Theorie. Für die Analyse diente ein Präparat, das dreimal aus heißem Wasser umkristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet war.

0,2413 g Sbst.: 0,4723 g CO_2, 0,1225 g H_2O. — 0,2322 g Sbst.: 25,4 ccm N (22°, 763 mm).

$C_{10}H_{12}O_4N_2$. Ber. C 53,54, H 5,41, N 12,49.
Gef. „ 53,38, „ 5,69, „ 12,45.

Die Verbindung schmilzt bei 180—181° (korr. 183—184°) unter Gasentwickelung. Sie ist in Alkohol leicht, in Äther fast gar nicht löslich. Von Wasser verlangt sie bei 100° etwa 16 Teile und bei 20° etwa 200 Teile zur Lösung (Bestimmung nur approximativ). Aus heißer, wässeriger, nicht zu konzentrierter Lösung kristallisiert sie beim langsamen Erkalten in langen, anscheinend rechtwinkeligen Tafeln, die meist zu Rosetten verwachsen sind. Im Gegensatz zu den Phenylcyanatderivaten der gewöhnlichen α-Aminosäuren wird sie durch Kochen und Abdampfen mit 25-prozentiger Salzsäure nicht in das Anhydrid verwandelt.

Reduktion des Isoserins.

Die Operation wurde ebenso ausgeführt wie beim Serin. Die Ausbeute an β-Aminopropionsäure betrug 65% der Theorie. Das Präparat schmolz nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser ebenso wie eine

aus β-Jodpropionsäure hergestellte Vergleichsprobe bei 195—196°[1]) (korr. 199—200°). Zur weiteren Identifizierung haben wir das β-Alanin aus dem Isoserin in der gewöhnlichen Weise in alkalischer Lösung mit Phenylcyanat kombiniert. Die Ausbeute an β-Phenylureïdopropionsäure betrug mehr als 80% der Theorie. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser schmolz das Präparat bei 171° (korr. 174°) und gab nach dem Trocknen über Schwefelsäure folgende Zahlen:

0,1853 g Sbst.: 0,3896 g CO_2, 0,0974 g H_2O.

$C_{10}H_{12}O_3N_2$. Ber. C 57,66, H 5,82.

Gef. „ 57,34, „ 5,89.

Die Verbindung ist bereits von Hoogewerff und van Dorp[2]) auf ganz anderem Wege, nämlich aus Succinylphenylbromamid und Kalilauge erhalten worden, und ihre Angaben, besonders über den Schmelzpunkt, stimmen mit unseren Beobachtungen überein.

Wir haben endlich noch die Verbindung nach der Vorschrift von Hoogewerff und van Dorp[3]) durch Erhitzen mit Acetylchlorid in ihr Anhydrid, das Phenyldihydrouracil, übergeführt und fanden ebenfalls den Schmp. 231—234° (korr. 236—239°).

Hiernach kann kein Zweifel sein, daß die durch Reduktion des Isoserins entstehende Aminosäure identisch mit dem β-Alanin ist.

α-Amino-γ-oxy-valeriansäure, $CH_3.CH(OH).CH_2.CH(NH_2).CO_2H$.

20 g Aldol werden zunächst durch Auflösen in der gleichen Menge Äther, Abkühlen auf 0° und Einleiten von Ammoniak auf bekannte Art in Aldolammoniak übergeführt, das als fast farbloses Öl aus dem Äther ausfällt und mechanisch leicht davon getrennt werden kann. Vermischt man dieses Produkt mit der berechneten Menge wasserfreier Blausäure (9 ccm) und läßt 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, so resultiert ein schwach rötlich gefärbtes, dickes Öl, welches zur Verseifung der Nitrilgruppe zunächst in 100 ccm Salzsäure (spez. Gewicht 1,19), die mit Eis gekühlt ist, langsam eingetragen wird. Die hierbei entstehende, braunrote Lösung wird nach dem Verdünnen mit 100 ccm Wasser eine Stunde lang gekocht, dann im Vakuum zur Entfernung der Salzsäure abgedampft, der Rückstand in 1 L Wasser gelöst, mit Bleioxyd

---

[1]) Derselbe Schmelzpunkt ist von Hoogewerff und van Dorp (Rec. Trav. chim. Pays-Bas **10**, 5) gefunden worden. Die Angabe von Kwisda (Wiener Monatshefte **12**, 422), daß das β-Alanin bei 220° noch nicht schmilzt, ist demnach unrichtig.

[2]) Rec. Trav. chim. Pays-Bas **9**, 54.

[3]) Rec. Trav. chim. Pays-Bas **9**, 57.

gekocht, bis das Ammoniak vertrieben und das Chlor gefällt ist, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und die Mutterlauge auf dem Wasserbade verdampft. Dabei bleibt die Aminosäure als rotbraun gefärbte Masse zurück. Sie wird durch mehrmaliges Umkristallisieren aus heißem 80-prozentigem Alkohol gereinigt. Die Ausbeute an reiner Säure betrug etwa 30% der Theorie.

Für die Analyse war das Präparat im Vakuum getrocknet.

0,1848 g Sbst.: 0,3084 g CO_2, 0,1370 g H_2O. — 0,2003 g Sbst.: 0,3315 g CO_2, 0,1475 g H_2O. — 0,1529 g Sbst.: 13,5 ccm N (18⁰, 772 mm).

$C_5H_{11}O_3N$.	Ber.	C 45,08,	H 8,34,	N 10,52.
	Gef.	„ 45,51, 45,14,	„ 8,31, 8,26,	„ 10,37.

Die Säure kristallisiert aus heißem, verdünntem Alkohol in farblosen, zugespitzten und meist sternförmig verwachsenen mikroskopischen Blättchen. Sie ist auch in kaltem Wasser sehr leicht (annähernd in $1^1/_2$ Teilen), in absolutem Alkohol aber schwer löslich. Im Kapillarrohr rasch erhitzt, schmilzt sie gegen 212⁰ unter Zersetzung. Sie schmeckt süß, reagiert neutral und löst Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe.

Das Kupfersalz wurde in der gewöhnlichen Weise mit Kupferoxyd hergestellt. Es kristallisiert in sechsseitigen Tafeln von regelmäßigem Habitus. Für die Analyse war es an der Luft getrocknet; es enthält kein Kristallwasser.

0,3016 g Sbst.: 0,0730 g CuO.

$Cu(C_5H_{10}O_3N)_2$. Ber. Cu 19,40. Gef. Cu 19,34.

Das Salz löst sich mit dunkelblauer Farbe in Wasser, wovon in der Kälte annähernd 13 Teile, in der Hitze viel weniger zur Lösung notwendig sind. In Alkohol ist es unlöslich.

Lacton der α-Amino-γ-oxy-valeriansäure.

Ob beim Stehen oder Eindampfen einer wässerigen Lösung der Oxyaminosäure schon Lactonbildung eintritt, können wir nicht sagen. Sehr rasch erfolgt dieselbe aber bei der Behandlung mit Alkohol und Salzsäure, die bei den gewöhnlichen Aminosäuren Ester liefert.

4 g der Säure wurden mit 20 ccm absolutem Alkohol übergossen und Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet, wobei klare Lösung erfolgte. Als dann $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbade erwärmt wurde, fiel schon in der Hitze das Hydrochlorat des Lactons in glänzenden Blättchen oder kleinen Prismen aus, welche, aus Alkohol umkristallisiert, beim Erhitzen im Kapillarrohr bei 194—196⁰ (korr. 198—200⁰) unter Zersetzung schmolzen und, über Schwefelsäure getrocknet, die Zusammensetzung $C_5H_9O_2N.HCl$ hatten.

0,2311 g Sbst.: 0,2189 g AgCl.

Ber. Cl 23,42. Gef. Cl 23,43.

Um die Lactonbildung sicher zu Ende zu führen, wurde die erste alkoholische Mutterlauge unter stark vermindertem Druck verdampft, der Rückstand der gleichen Behandlung mit Alkohol und Salzsäure unterworfen und dann die Flüssigkeit zur völligen Gewinnung des Hydrochlorats wieder im Vakuum abgedampft.

Zur Darstellung des freien Lactons wird das salzsaure Salz in möglichst wenig Wasser gelöst, stark abgekühlt und eine sehr konzentrierte Lösung von Kaliumcarbonat zugegeben. Extrahiert man dann wiederholt mit ziemlich viel Äther, trocknet den letzteren rasch mit Natriumsulfat und verdunstet ihn, so bleibt das Lacton in einer Ausbeute von 90% der Theorie als basisch riechendes Öl zurück, welches unter 13 mm Druck bei 123—125° kocht.

0,3372 g Sbst.: 0,6424 g CO_2, 0,2442 g H_2O. — 0,2791 g Sbst.: 28,6 ccm N (18°, 765 mm).

$C_5H_9O_2N$. Ber. C 52,13, H 7,91, N 12,16.
Gef. „ 51,96, „ 8,12, „ 11,92.

Das Lacton ist eine farblose, hygroskopische Flüssigkeit, deren wässerige Lösung stark basisch reagiert.

Läßt man die reine Verbindung bei Zimmertemperatur einige Stunden stehen, so beginnt die Abscheidung von Kristallen, und nach mehreren Tagen ist die Masse völlig erstarrt. Die gleiche Umwandlung erfolgt auch in ätherischer Lösung; dies ist der Grund, weshalb man bei der Darstellung des freien Lactons schnell operieren muß.

Das feste Umwandlungsprodukt hat die Eigenschaften eines Diacipiperazins.

Di-β-oxypropyl-Diacipiperazin,

$$CH_3.CH(OH).CH_2.CH.CO.NH$$
$$NH.CO.CH.CH_2.CH(OH).CH_3 .$$

Die Verbindung wird am besten durch mehrtägiges Stehenlassen des zuvor beschriebenen Lactons gewonnen und durch Umkristallisieren aus heißem Alkohol gereinigt. Sie scheidet sich daraus in Aggregaten von beiderseits zugespitzten Blättchen ab, welche bei 218—220° (korr. 223—225°) schmelzen und für die Analyse über Schwefelsäure getrocknet waren.

0,1844 g Sbst.: 0,3529 g CO_2, 0,1324 g H_2O. — 0,1747 g Sbst.: 18,2 ccm N (18°, 762 mm).

$C_{10}H_{18}O_4N_2$. Ber. C 52,13, H 7,91, N 12,16.
Gef. „ 52,19, „ 8,05, „ 12,06.

Für die Bestimmung des Molekulargewichtes diente die wässerige Lösung.

0,1787 g Sbst., in 15 g Wasser gelöst, erniedrigten den Gefrierpunkt um 0,101°.

$C_{10}H_{18}O_4N_2$. Ber. Mol.-Gew. 230,2. Gef. Mol.-Gew. 224.

Die Verbindung ist geruchlos; sie kann unter 10 mm Druck nicht destilliert werden. Sie ist in Äther äußerst schwer, in Wasser dagegen leicht löslich. Diese Lösung reagiert neutral und färbt sich beim Kochen mit gefälltem Kupferoxyd nicht blau.

Alle diese Eigenschaften stehen mit der oben angenommenen Strukturformel in Einklang.

Phenylcyanatverbindung der α-Amino-γ-oxy-valeriansäure.

Löst man die Oxyaminosäure in etwas mehr als der für 1 Molekül berechneten Menge Normal-Natronlauge und schüttelt bei 0° mit Phenylcyanat, bis die Abscheidung von Diphenylharnstoff beginnt, so ist der neue Körper in der alkalischen Lösung enthalten und scheidet sich daraus beim Ansäuern als Öl ab, welches aber bald kristallinisch erstarrt. Die Ausbeute betrug 80% der Theorie. Für die Analyse wurde das Präparat zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1927 g Sbst.: 0,4340 g CO_2, 0,1050 g H_2O. — 0,1932 g Sbst.: 0,4357 g CO_2, 0,1051 g H_2O. — 0,1961 g Sbst.: 20,3 ccm N (18°, 760 mm).

$C_{12}H_{14}O_3N_2$.	Ber.	C 61,51,	H 6,02,	N 11,96.
	Gef.	„ 61,42, 61,50,	„ 6,11, 6,10,	„ 11,96.

Wie die Zahlen zeigen, findet zugleich mit der Addition des Phenylcyanats Abspaltung von 1 Mol. Wasser statt, und da das so entstehende Anhydrid in Natronlauge wieder leicht löslich ist, wahrscheinlich unter Rückbildung der Säure, so glauben wir, daß hier die Phenylcyanatverbindung des zuvor beschriebenen Lactons vorliegt, daß also der Körper die Struktur

```
          O————————————┐
          |            |
CH3.CH.CH2.CH.CO
                    NH.CO.NH.C6H5
```

hat.

Der Schmelzpunkt liegt bei 163—164° (korr. 165—166°). Die Substanz ist in kaltem Wasser sehr schwer, in heißem erheblich leichter löslich und kristallisiert daraus in farblosen Nadeln oder Prismen; in Alkohol und Aceton löst sie sich leicht, in Äther aber wieder sehr schwer.

Reduktion der α-Amino-γ-oxy-valeriansäure.

2 g der Säure wurden mit 0,6 g rotem Phosphor und 20 ccm rauchender Jodwasserstoffsäure (spez. Gewicht 1,96) im Rohr 5 Stunden auf 140° erhitzt und die Flüssigkeit wie gewöhnlich auf Aminosäure verarbeitet. Das Produkt, dessen Menge 1 g betrug, schmolz nach wiederholtem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol unter Zersetzung gegen 280° (korr. 290°) und zeigte auch in den sonstigen Eigenschaften Übereinstimmung mit der α-Amino-*n*-valeriansäure. Für die Analyse wurde das Kupfersalz benutzt, welches in lufttrockenem Zustand kein Kristallwasser enthielt.

0,1318 g Sbst.: 0,0354 g CuO.

$(C_5H_{10}O_2N)_2Cu$. Ber. Cu 21,50. Gef. Cu 21,46.

Galaheptosaminsäure,

$CH_2(OH).CH(OH).CH(OH).CH(OH).CH(OH).CH(NH_2).COOH$.

Als Ausgangsmaterial diente das Galactosiminammoniak, welches man aus Galactose und methylalkoholischem Ammoniak nach der Vorschrift von Lobry de Bruyn und van Leent[1]) erhält.

35 g des frisch bereiteten, nur abfiltrierten und abgepreßten Präparates werden mit überschüssiger Blausäure (16 ccm wasserfreier Säure) übergossen und dann 20 ccm Wasser zugegeben. In 10—15 Minuten ist eine klare Lösung entstanden, die sich langsam von selbst auf etwa 40° erwärmt und gleichzeitig färbt. Wenn sie nach etwa 3 Stunden anfängt, dunkelbraun zu werden, gießt man sie langsam in 200 ccm Salzsäure (spez. Gewicht 1,19), welche mit Eis gekühlt ist. Nach eintägigem Stehen wird die schmutzigbraune Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck möglichst weit eingedampft, dann der Rückstand in 150 ccm Wasser gelöst und mit Natronlauge versetzt, bis die Flüssigkeit stark nach Ammoniak riecht, aber noch unzersetztes Chlorammonium enthält. Wird jetzt das in Freiheit gesetzte Ammoniak weggekocht und die Flüssigkeit in Eis abgekühlt, so scheidet sich die schwer lösliche Galaheptosaminsäure als schwach gefärbte Kristallmasse ab. Die Ausbeute beträgt 20—25% der Theorie. Einmaliges Umkristallisieren unter Zusatz von etwas Tierkohle genügt, um ein reines, farbloses Präparat zu gewinnen.

Für die Analyse war der Körper nochmals aus Wasser umkristallisiert. Die über Schwefelsäure getrocknete Verbindung enthält ein Molekül Kristallwasser, das bei 130° entweicht.

---

[1]) Rec. Trav. chim. Pays-Bas **14**, 140.

0,1940 g Sbst.: 0,2463 g CO_2, 0,1235 g H_2O. — 0,2291 g Sbst.: 11,6 ccm N (19°, 765,5 mm).

$C_7H_{15}O_7N + H_2O$. Ber. C 34,54, H 6,99, N 5,76.
Gef. „ 34,63, „ 7,14, „ 5,81.

0,4909 g Sbst. verloren bei 130° 0,0364 g H_2O.

$C_7H_{15}O_7N + H_2O$. Ber. H_2O 7,41. Gef. H_2O 7,41.

0,1897 g der bei 130° getrockneten Sbst.: 0,2589 g CO_2, 0,1145 g H_2O.

$C_7H_{15}O_7N$. Ber. C 37,30, H 6,75.
Gef. „ 37,22, „ 6,77.

Die Säure kristallisiert in mikroskopischen, rechtwinkeligen Tafeln oder Prismen. In Wasser ist sie verhältnismäßig schwer löslich, denn sie verlangt beim Kochen ungefähr 30 Teile. Bei 20° ist die Löslichkeit 1 : 962; für die Bestimmung dieses Wertes diente eine Lösung, welche durch 5-stündiges Schütteln der gepulverten Substanz mit Wasser bei 20° hergestellt war. In Alkohol und Äther ist die Säure unlöslich. Beim Erhitzen im Kapillarrohr bräunt sie sich von 210° an und schmilzt gegen 235° (korr. 240°) unter Gasentwickelung. Sie löst sich leicht in Natronlauge und auch in überschüssigem Ammoniak. Beim Kochen der Lösung wird aber das Ammoniumsalz unter Entweichen der Base ganz zersetzt. Ferner wird die Galaheptosaminsäure leicht von 5-prozentiger Salzsäure aufgenommen, aber durch Zusatz von Alkohol unverändert wieder abgeschieden. Die Lösung in 5-prozentiger Salzsäure zeigt schwache Rechtsdrehung.

1,2967 g wasserfreie Säure in 13,513 g 5-prozentiger Salzsäure gelöst; 8,76 Prozentgehalt, spez. Gewicht 1,058, drehte im 2-Dezimeterrohr bei 20° Natriumlicht 2,08° nach rechts,

mithin $[\alpha]_D^{20} = +11,23°$.

Das Kupfersalz ist auch in heißem Wasser so schwer löslich, daß es sich auf die gewöhnliche Art schlecht darstellen läßt. Man gewinnt es am besten, indem man die Säure in der berechneten Menge Natronlauge löst und mit Kupfersulfat fällt. Für die Analyse wurde der schwach blaue Niederschlag aus heißem Wasser, wovon ungefähr 800 Teile zur Lösung notwendig sind, umkristallisiert. Beim Abkühlen fiel das Salz als hellblau gefärbte, feinkörnige Masse so vollständig aus, daß die Flüssigkeit kaum noch blau gefärbt war und Kupfer nur mehr in Spuren enthielt.

Im lufttrocknen Zustand enthält das Salz 2 Mol. Wasser, welche bei 130° entweichen.

0,2640 g Sbst. verloren bei 130° 0,0169 g H_2O und gaben 0,0380 g CuO.

$(C_7H_{14}O_7N)_2Cu + 2\,H_2O$. Ber. H_2O 6,58, Cu 11,61.
Gef. „ 6,40, , 11,50.

Synthese der *l*-Glucosaminsäure.

Im Gegensatz zur Galactose fixiert die Arabinose bekanntlich nur ein Molekül Ammoniak.

20 g von diesem Arabinosimin, das nach der Vorschrift von Lobry de Bruyn und van Leent[1]) dargestellt war, wurden mit einem Gemisch von 10 ccm Wasser und 4,8 ccm reiner Blausäure (1 Mol.) übergossen und in verschlossenem Gefäß eine halbe Stunde auf 40° erhitzt. Zuerst entstand eine dünnflüssige Lösung, die aber bald dickflüssig wurde und anfing, sich dunkel zu färben. Diese Masse wurde in 100 ccm stark gekühlter Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) eingetragen, 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt, dann unter stark vermindertem Druck möglichst verdampft und der Rückstand mit überschüssigem Barytwasser wieder im Vakuum abgedampft, um Ammoniak zu entfernen. Nachdem jetzt der Baryt durch Schwefelsäure abgeschieden und überschüssige Schwefelsäure und Salzsäure durch Kochen mit Bleioxyd gefällt waren, wurde das Filtrat durch Schwefelwasserstoff entbleit, dann im Vakuum stark konzentriert und mit Alkohol versetzt. Der hierbei entstehende Niederschlag ist eine dunkle, amorphe Masse. Reibt man ihn mit wenig Wasser (6 ccm) an, so gehen die sirupösen Produkte in Lösung, während die Glucosaminsäure zurückbleibt und durch Trocknen auf Ton von der dunklen Mutterlauge leicht befreit werden kann. Die Ausbeute betrug 2 g, mithin nur 10% des angewandten Arabinosimins. Der Verlust ist wohl zum Teil durch die ungenügende Isolierungsmethode bedingt; noch mehr aber wird die Ausbeute durch den unvollständigen Verlauf der Blausäureaddition und die Empfindlichkeit des hierbei entstehenden Aminonitrils verringert.

Zur Reinigung haben wir die *l*-Glucosaminsäure aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert. Für die Analyse war sie bei 100° getrocknet.

0,1861 g Sbst.: 0,2515 g CO_2; 0,1129 g H_2O. — 0,1878 g Sbst.: 11,1 ccm N (20°, 770 mm).

$C_6H_{13}O_6N$. Ber. C 36,92, H 6,66, N 7,18.
Gef. „ 36,86, „ 6,80, „ 6,86.

Die Säure kristallisiert aus Wasser in farblosen, rechtwinkeligen Tafeln oder Blättchen, auch in Nadeln. Ohne zu schmelzen, zersetzt sie sich über 250° in dunkle Produkte. Sie gleicht in diesen äußeren Eigenschaften völlig der *d*-Glucosaminsäure.

Zum weiteren Vergleich diente die Bestimmung des optischen Verhaltens und der Löslichkeit. Das Drehungsvermögen der Säure in wässe-

---

[1]) Rec. Trav. chim. Pays-Bas **14**, 145.

riger Lösung ist sehr schwach, und seine Bestimmung wird noch durch ihre geringe Löslichkeit erschwert.

Für die folgenden Versuche diente deshalb eine übersättigte Lösung von 6,60%.

Erheblich größer wird die Drehung in salzsaurer Lösung, und hier wurde auch eine geringe Multirotation beobachtet.

l-Verbindung.

a) 0,3000 g Sbst., gelöst in 4,25 g H_2O = 6,60% drehten bei 20° im 1-Dezimeterrohr gelbes Licht 0,26° nach rechts.

b) 0,3961 g Sbst., gelöst in 4,095 g $2^1/_2$-proz. Salzsäure = 8,82% spez. Gewicht 1,046, drehten im 1-Dezimeterrohr bei 18° gelbes Licht

nach kurzer Zeit 1,50° nach rechts,
„ 48 Stunden 1,32° „ „ ,
mithin Enddrehung $[\alpha]_D^{18} = +14,31°$.

d-Verbindung.

a) 0,386 g Sbst. in 5,46 g H_2O = 6,60% drehten bei 20° im 1-Dezimeterrohr gelbes Licht 0,24° nach links.

0,3505 g Sbst. in 5,00 g H_2O = 6,60% drehten bei 20° im 1-Dezimeterrohr gelbes Licht 0,24° nach links.

b) 0,4200 g Sbst., gelöst in 4,2044 g $2^1/_2$-proz. Salzsäure= 9,09% spez. Gewicht 1,047, drehten im 1-Dezimeterrohr bei 18° gelbes Licht

nach 1 Stunde 1,50° nach links,
„ 30 Stunden 1,41° „ „ ,
mithin Enddrehung $[\alpha]_D^{18} = -14,81°$.

0,4750 g Sbst. in 4,8455 g $2^1/_2$-prozentiger Salzsäure = 8,93% spez. Gewicht 1,047, drehten bei 18° im 1-Dezimeterrohr gelbes Licht

nach kurzer Zeit 1,57° nach links,
„ 30 Stunden 1,37° „ „ ,
mithin Enddrehung $[\alpha]_D^{18} = -14,65°$ [1]).

Zur Bestimmung der Löslichkeit der Säuren dienten gesättigte Lösungen, die durch 5-stündiges Schütteln der feingepulverten Substanz mit Wasser von 20° im Thermostaten hergestellt waren.

	d-Glucosaminsäure:	*l*-Glucosaminsäure:
Löslichkeit:	1 Teil in 38,6 Teilen H_2O ,	1 Teil in 34,0 Teilen H_2O ,
	1 „ „ 37,3 „ „	1 „ „ 33,7 „ „
		1 „ „ 33,8 „ „
		1 „ „ 34,1 „ „

[1]) In der früheren Abhandlung über *d*-Glucosaminsäure (Chitaminsäure) sind nur annähernde Werte angegeben, und leider ist auch infolge eines Versehens die Drehungsrichtung in wässeriger Lösung falsch angeführt. (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **27**, 143 [1894].)

Der Unterschied in der Löslichkeit beider Präparate ist zwar nicht so groß, daß er wesentlich für die zu entscheidende Frage in Betracht käme, aber wir müssen doch bemerken, daß es uns auch durch wiederholtes Umkristallisieren des synthetischen Produktes nicht gelungen ist, andere Werte zu bekommen. Es scheint demnach die Säure in kleiner Menge einen Fremdkörper, vielleicht ein Isomeres, zu enthalten, das durch Umlösen nicht entfernt werden kann.

Um den letzten Zweifel an den Beziehungen beider Säuren zueinander zu beseitigen, haben wir deshalb den Racemkörper hergestellt.

Racemische Glucosaminsäure.

Jede der beiden aktiven Säuren löst sich in ungefähr der 5-fachen Menge heißem Wasser; für ein Gemisch derselben ist aber eine viel größere Quantität nötig, weil sich alsbald der Racemkörper bildet.

Es wurden deshalb je 0,5 g der beiden optisch-aktiven Säuren in zusammen 25 ccm kochendem Wasser gelöst. Beim Abkühlen erfolgte bald die Abscheidung von mikroskopisch kleinen, sehr dünnen Prismen, die vielfach wie Nadeln aussahen. Bei Zimmertemperatur betrug die Menge der ausgefallenen Kristalle 0,85 g. Diese verlangten zur Auflösung etwa die 24-fache Menge kochendes Wasser und nach 4-stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur waren wieder 0,75 g ausgefallen.

Für die Analyse war das Präparat bei 100° getrocknet.

0,1814 g Sbst.: 0,2454 g CO_2, 0,1101 g H_2O.

$C_6H_{13}O_6N$. Ber. C 36,92, H 6,66.

Gef. „ 36,89, „ 6,80.

Die Säure verhält sich beim Erhitzen genau so wie die aktiven Komponenten, unterscheidet sich aber von diesen durch die viel geringere Löslichkeit in Wasser. Mit einer Lösung, welche durch 6-stündiges Schütteln der fein gepulverten Substanz mit Wasser bei 20° hergestellt war, fanden wir das Verhältnis 1 : 574. Aus dieser starken Verringerung der Löslichkeit darf man schließen, daß es sich um einen wahren Racemkörper handelt. Selbstverständlich haben wir auch das optische Verhalten geprüft. Eine Lösung in $2^1/_2$-prozentiger Salzsäure, welche 4,5% der Aminosäure enthielt, erwies sich als völlig inaktiv.

18. Emil Fischer und Hermann Leuchs: Synthese des *d*-Glucosamins.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **36**, 24 (1902).
(Eingegangen am 23. Dezember.)

Vor kurzem teilten wir mit[1]), daß die natürliche *l*-Arabinose durch Behandlung mit Ammoniak und Blausäure in *l*-Glucosaminsäure, d. h. den optischen Antipoden derjenigen Oxyaminosäure, die aus Glucosamin durch Oxydation mit Brom und Wasser entsteht, verwandelt werden kann. Denselben Versuch haben wir jetzt mit der *d*-Arabinose ausgeführt und, wie zu erwarten war, die *d*-Glucosaminsäure erhalten. Wie bereits in der vorigen Abhandlung kurz bemerkt ist, läßt sich letztere auf einem kleinen Umwege durch Reduktion in *d*-Glucosamin verwandeln, und es ist nun möglich, vom Traubenzucker über die *d*-Arabinose zum *d*-Glucosamin zu gelangen, womit dessen totale Synthese verwirklicht wird.

Durch die Synthese ist die Frage nach der Struktur und der Konfiguration des *d*-Glucosamins in den wesentlichen Punkten gelöst. Man hat es zu betrachten als ein Derivat des Traubenzuckers oder der *d*-Mannose, in welcher das in der α-Stellung befindliche Hydroxyl durch Amid ersetzt ist.

Wir geben ihm deshalb die Konfigurationsformel:

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\quad\;\; H \quad\;\; H \quad\;\; OH \\ CH_2(OH).\dot{C}\text{——}\dot{C}\text{——}\dot{C}.CH(NH_2).COH\,. \\ \qquad\qquad\quad\;\; \dot{O}H \;\; \dot{O}H \;\; H \end{array}$$

In derselben ist nur die sterische Anordnung der Aminogruppe an dem α-Kohlenstoff noch unbestimmt, und für die Annahme der Aldehydgruppe gilt der gleiche Vorbehalt wie bei den Zuckern.

Bei der viel größeren Verbreitung des Traubenzuckers in der Natur wird man selbstverständlich der Annahme, daß das Glucosamin sich von ihm ableite, die größere Wahrscheinlichkeit zumessen, aber der direkte Beweis dafür fehlt augenblicklich noch. Immerhin ist die Kon-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3787 [1902]. (*S. 248.*)

stitution des Glucosamins jetzt soweit aufgeklärt, daß man es mit Sicherheit als ein Mittelding zwischen den wichtigsten Hexosen und den Oxy-α-aminosäuren betrachten darf. Da letztere nach den neueren Beobachtungen in den Proteïnstoffen häufig vorkommen[1]), so bildet das Glucosamin bis zu einem gewissen Grad eine Brücke zwischen Kohlehydrat und Proteïnkörper.

Angesichts dieses abschließenden Resultates scheint es uns gerechtfertigt, einen kurzen Rückblick auf diejenigen Arbeiten, welche die Konstitution des Glucosamins betreffen, zu geben. Eine ausführliche Darstellung seiner Geschichte findet man in der Abhandlung von H. Steudel[2]). Der Entdecker der Base, Ledderhose[3]), hat ihre Ähnlichkeit mit den Hexosen erkannt und durch die Wahl des Namens zum Ausdruck gebracht. Aber sein Versuch, es durch salpetrige Säure in einen bekannten Zucker überzuführen, mißlang. Einen erheblichen Fortschritt brachten die Beobachtungen von Tiemann[4]), der das Glucosamin einerseits durch Salpetersäure in die sog. Isozuckersäure und andererseits durch Phenylhydrazin in Phenylglucosazon überführte. Damit war die Anwesenheit einer normalen Kohlenstoffkette bewiesen, und die Bildung des Phenylglucosazons deutete auf eine nahe Verwandtschaft mit dem Traubenzucker hin, aber die Stellung der Aminogruppe blieb doch zweifelhaft, und auch die Anwesenheit einer Aldehydgruppe war noch nicht definitiv bewiesen.

Die Beseitigung dieser Zweifel war der Zweck der Versuche von Tiemann und E. Fischer[5]). Ihnen gelang die Oxydation der Base zur entsprechenden Aminosäure, welche von ihnen Chitaminsäure genannt und von uns neuerdings in *d*-Glucosaminsäure umgetauft wurde. Sie untersuchten ferner das zuckerartige Produkt, das schon Ledderhose durch Einwirkung von salpetriger Säure erhalten hatte, und sie konnten daraus durch Oxydation eine einbasische Säure, die sog. Chitonsäure, gewinnen, deren kristallisierte Calciumsalz die Zusammensetzung $Ca(C_6H_{11}O_7)_2$[6]) zeigte, und die ganz verschieden von den gewöhnlichen Hexonsäuren war. Da ferner die Chitaminsäure (jetzt *d*-Glucosaminsäure) weder durch salpetrige Säure in eine normale Hexonsäure,

---

1) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2660 [1902]. (*S. 680.*)

2) Zeitschr. für physiol. Chem. **34**, 353 [1902].

3) Zeitschr. für physiol. Chem. **2**, 213 [1878].

4) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 241 [1884]; **19**, 49 [1886].

5) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **27**, 138 [1894].

6) Nach neueren Beobachtungen, die ich in Gemeinschaft mit J. P. Andrae gemacht habe, lassen sich aus dem Salz noch zwei Moleküle Wasser durch Erhitzen im Vakuum austreiben, so daß die Chitonsäure die wasserärmere Formel $C_6H_{10}O_6$ hat und wohl als Derivat des Furfurans zu betrachten ist. E. Fischer.

noch durch Reduktion in α-Amino-*n*-capronsäure übergeführt werden konnte, so mußten Tiemann und E. Fischer ihre Resultate dahin zusammenfassen, daß die Frage nach der Konstitution des Glucosamins, speziell nach der Stellung der Aminogruppe noch als offen anzusehen sei.

In neuerer Zeit hat H. Steudel[1]) eine Verbindung des Glucosamins mit dem Phenylcyanat beobachtet, welche ähnlich den Derivaten der α-Aminosäuren leicht in ein Anhydrid übergeht, und ähnliche anhydridartige Produkte erhielten C. Neuberg und H. Wolff[2]) auch mit Hilfe von Phenyl- oder Allylsenföl. Sie sowohl wie Steudel folgern daraus, daß das Glucosamin ein α-Aminoaldehyd sei. Wir müssen aber darauf aufmerksam machen, daß dieser Schluß nicht stichhaltig ist, da die β-Aminoaldehyde nach den Beobachtungen von Wohl und Wohlberg beim β-Aminopropionaldehyd[3]) gegen Senföle das gleiche Verhalten zeigen und auch die Harnstoffderivate der β-Aminosäuren leicht durch Wasserabspaltung in Hydrouracile übergehen. Wir fassen deshalb das Resultat der Beobachtungen von Tiemann, Steudel, Neuberg und Wolff dahin zusammen, daß die α-Stellung der Aminogruppe zwar wahrscheinlich gemacht, aber nicht definitiv bewiesen war. Die letzten Zweifel über diesen Punkt wurden erst durch die von uns kürzlich beschriebene Synthese der *l*-Glucosaminsäure[4]) beseitigt, und kurz nachher teilte C. Neuberg[5]) mit, daß ihm die Reduktion der *d*-Glucosaminsäure zur α-Amino-*n*-capronsäure gelungen sei.

Synthese der *d*-Glucosaminsäure.

Die Anlagerung des Ammoniaks an die *d*-Arabinose findet unter denselben Bedingungen statt, wie sie von Lobry de Bruyn und van Leent[6]) für *l*-Arabinose beschrieben sind.

50 g des so erhaltenen *d*-Arabinosimins, welches selbstverständlich der bekannten *l*-Verbindung durchaus ähnlich ist, wurden in 2 Portionen mit Blausäure genau in der gleichen Weise behandelt, wie wir es früher für die Bereitung der *l*-Glucosaminsäure beschrieben haben. Die Ausbeute an *d*-Glucosaminsäure betrug auch hier ungefähr 10% des angewandten Imins. Die Analyse des zweimal aus Wasser umkristallisierten, bei 100° getrockneten Präparates gab folgende Zahlen:

---

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. **34**, 368 [1902].
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 3840 [1901].
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 1919 [1901].
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3787 [1902].
[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 4009 [1902].
[6]) Rec. Trav. chim. Pays-Bas **14**, 145.

0,1915 g Sbst.: 0,2605 g CO_2, 0,1149 g H_2O. — 0,2006 g Sbst.: 12 ccm N (20°, 772 mm).

$C_6H_{13}O_6N$. Ber. C 36,92, H 6,66, N 7,18.
Gef. „ 37,10, „ 6,73, „ 6,96.

Die Säure zeigte völlige Übereinstimmung mit dem aus *d*-Glucosamin gewonnenen Produkt, wie insbesondere folgender Vergleich der Löslichkeit und des optischen Verhaltens erkennen läßt.

	Synthetische Säure	Säure aus *d*-Glucosamin
Löslichkeit	1 T. in 36,7 T. H_2O.	1 T. in 38,6 T. H_2O
		1 „ „ 37,3 „ „

Für die Bestimmung des ersten Wertes diente wie früher eine gesättigte Lösung, die durch 5-stündiges Schütteln der feingepulverten Substanz mit Wasser von 20° im Thermostaten hergestellt war. Für die Ermittlung des Drehungsvermögens wurde eine Lösung von 0,3947 g des synthetischen Präparates in 4,073 g $2^1/_2$-prozentiger Salzsäure benutzt. Sie hatte das spez. Gewicht 1,046, enthielt 8,84% Aminosäure und drehte im 1-Dezimeterrohr gelbes Licht bei 18°

nach etwa 10 Minuten . . 1,51° nach links
„ 24 Stunden . . . . . 1,35° „ „
„ 30 „ . . . . . 1,34° „ „

mithin Enddrehung $[\alpha]_D^{18} = -14{,}49°$, während für *d*-Glucosaminsäure aus Glucosamin bei 2 Versuchen $[\alpha]_D^{18} = -14{,}81°$ und $-14{,}65°$ gefunden wurde.

Reduktion der *d*-Glucosaminsäure zu *d*-Glucosamin.

Die Glucosaminsäure zeigt gegen Alkohol und Salzsäure ein ähnliches Verhalten wie die früher beschriebene α-Amino-γ-oyxvaleriansäure[1]). Suspendiert man 3 g der fein gepulverten Säure in 45 ccm absolutem Alkohol und leitet einen starken Strom gasförmiger Salzsäure ohne Kühlung ein, so geht der größte Teil der Substanz in Lösung; aber bald nachher fällt in der Regel ein farbloser, voluminöser Körper aus, der die Flüssigkeit breiartig erfüllt und vielleicht das Hydrochlorat des Esters ist. Beim weiteren Einleiten von Salzsäure und Erwärmen auf dem Wasserbade verschwindet dieses Produkt wieder, bis schließlich klare Lösung erfolgt. Werden nun Alkohol und Salzsäure unter stark vermindertem Druck verdampft, so hinterbleibt ein schwach gefärbter Sirup. Nach Analogie mit der zuvor erwähnten α-Amino-γ-oxyvaleriansäure halten wir dieses Produkt für das salzsaure Lacton der *d*-Glucosaminsäure. Leider ist uns seine Kristallisation bisher nicht ge-

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3798 [1902]. (*S. 258.*)

lungen und daher auch die Analyse unterblieben. Wir haben deshalb den Sirup direkt der Reduktion unterworfen. Zu dem Zweck wurde er in 25 ccm Wasser gelöst und nach dem Abkühlen der Flüssigkeit bis zum Gefrieren $2^1/_2$-prozentiges Natriumamalgam in kleinen Portionen jedesmal unter starkem Schütteln zugefügt. Durch gleichzeitigen allmählichen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure wurde die Reaktion der Flüssigkeit stets schwach sauer gehalten. Nach dem Verbrauch von 30 g Amalgam war das Reduktionsvermögen der Flüssigkeit gegen Fehlingsche Lösung so stark, als wenn sie 1,12 g Traubenzucker enthalten hätte. Nimmt man an, daß diese Reduktionskraft ausschließlich von Glucosamin herrührt, so würde dies einer Ausbeute von ungefähr 40% der Theorie entsprechen. Da eine Trennung des Glucosamins von den Natriumsalzen kaum zu erzielen ist, so haben wir den Beweis für seine Anwesenheit indirekt einerseits durch die Bildung von Phenylglucosazon beim Erwärmen der Lösung mit essigsaurem Phenylhydrazin, andererseits durch Verwandlung in die von H. Steudel[1]) beschriebene Phenylcyanatverbindung geführt. Für die Gewinnung der letzteren wurde die Flüssigkeit schwach alkalisch gemacht und die der angewandten Glucosaminsäure entsprechende molekulare Menge Phenylcyanat tropfenweise unter starkem Schütteln zugesetzt, während gleichzeitig die Reaktion der Lösung durch allmähliche Zugabe von Natronlauge schwach alkalisch gehalten wurde. Der Beschreibung von Steudel entsprechend fiel dabei ein amorpher Niederschlag aus, der außer dem Phenylcyanatglucosamin etwas Diphenylharnstoff enthielt. Er wurde nach dem Filtrieren und Auswaschen mit kaltem Wasser mit 20-prozentiger Essigsäure (auf 1 g angewandte Säure etwa 15 ccm) übergossen und auf dem Wasserbade abgedampft. Der kristallinische Rückstand ließ sich durch Auslaugen mit wenig Alkohol und Aufstreichen auf Ton von schmierigen Bestandteilen befreien und bestand dann zum allergrößten Teil aus dem Anhydrid des Phenylcyanatglucosamins. Seine Menge betrug etwa 45% derjenigen Quantität, welche nach dem Reduktionsvermögen der Flüssigkeit hätte entstehen können. Für die Analyse wurde das Präparat zuerst aus heißem Alkohol, dann noch einmal aus wenig warmem Wasser umkristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet. Es hatte dann den von Steudel angegebenen Schmp. 210—211° (unkorr.) und die Zusammensetzung $C_{13}H_{16}O_5N_2$.

0,1858 g Sbst.: 0,3784 g CO_2, 0,0969 g H_2O. — 0,1967 g Sbst.: 16,8 ccm N (16°, 779 mm).

Ber. C 55,68, H 5,77, N 9,99.
Gef. „ 55,54, „ 5,85, „ 10,21.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**, 368 [1902].

Wie man sieht, entspricht obige Bildung des Glucosamins genau der Entstehung von Zuckern aus den entsprechenden einbasischen Säuren und ist zweifellos eine ebenso allgemeine Reaktion. Durch qualitative Versuche haben wir uns z. B. überzeugt, daß die Reduktion der früher von uns beschriebenen Galaheptosaminsäure nach dem gleichen Verfahren ausgeführt werden kann. Man wird auf diese Weise also eine größere Zahl von Verbindungen gewinnen können, die ähnlich dem Glucosamin konstituiert sind.

---

19. Emil Fischer und Umetaro Suzuki: Zur Kenntnis des Cystins.

Zeitschrift für physiologische Chemie 45, 405 (1905).
(Eingegangen am 29. Juni).

Wie wir vor einiger Zeit gezeigt haben[1]), läßt sich das Cystin durch Kombination mit den Chloriden der Chloressigsäure, Brompropionsäure und Brom-isocapronsäure vereinigen, und durch nachträgliche Behandlung der Produkte mit Ammoniak entstehen die Polypeptide, welche als Di-glycyl-, Di-alanyl- und Di-leucyl-Cystin bezeichnet wurden.

Um diese Synthese zu erweitern, haben wir jetzt in der üblichen Weise den Dimethylester des Cystins bereitet. Er ist ein stark alkalischer Sirup, bildet aber schön kristallisierende Salze, die so charakteristisch sind, daß sie sich recht gut zur Identifizierung des Cystins eignen. Wir haben sie benutzt, um die durch die Untersuchungen von Neuberg und Mayer[2]) aktuell gewordene Frage nach der Identität oder Verschiedenheit des Cystins aus Proteïnstoffen und aus Cystinsteinen zu prüfen.

Ein solcher Stein wurde uns in freundlichster Weise von Herrn Prof. Oscar Liebreich aus der Sammlung des Pharmakologischen Instituts der hiesigen Universität zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm auch hier unseren besten Dank aussprechen. Der Vergleich dieses Materials mit dem reinen optisch-aktiven Cystin aus Roßhaar hat uns zur Überzeugung geführt, daß völlige Gleichheit besteht. Auf die gleichlautenden Beobachtungen von Rothera und die etwas abweichenden Angaben von Neuberg und Mayer werden wir unten zurückkommen.

Cystin-dimethylester.

Suspendiert man 10 g gepulvertes reines aktives Cystin in 250 ccm trockenem Methylalkohol, und leitet ohne Abkühlung trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung ein, so findet klare Lösung statt, und nach einiger Zeit, besonders bei Abkühlung, beginnt die Kristallisation des

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4575. (*S. 395.*)
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 472.

salzsauren Dimethylesters. Um die Abscheidung zu vervollständigen, ist es vorteilhaft, das doppelte Volumen trockenen Äthers zuzusetzen. Das Produkt besteht aus farblosen Prismen, die bei langsamer Kristallisation eine Länge von mehreren Zentimetern haben können. Sie werden abgesaugt, mit trockenem Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Die Ausbeute beträgt 90—95% der Theorie.

Für die Analyse war das Präparat nochmals in wenig warmem Methylalkohol gelöst, mit etwas Tierkohle entfärbt, dann mit Äther abgeschieden, und im Vakuum bei 80° C getrocknet.

0,1911 g Substanz gaben 0,1949 g CO_2 : 0,0916 g H_2O.
0,1913 „ „ „ 13,4 ccm N (21°, 760 mm).
0,2470 „ „ „ 0,2047 g AgCl.

$C_8H_{16}N_2S_2O_4 2HCl$:		C	H	N	Cl
	Berechnet	28,15,	5,28,	8,21,	20,82.
	Gefunden	27,82,	5,33,	7,97,	20,50.

Das Salz löst sich außerordentlich leicht in Wasser, und die Flüssigkeit hat eine stark saure Reaktion. Es löst sich auch leicht in warmem Methylalkohol, etwas schwieriger in Äthylalkohol, sehr schwer in Essigäther und in Benzol und fast gar nicht in Äther und Petroläther. Das frisch bereitete und vor Feuchtigkeit sorgfältig geschützte Salz schmilzt gegen 170° (korr. 173°) unter starkem Schäumen und nachfolgender Braunfärbung. Der Schmelzpunkt wird aber herabgedrückt, wenn das Präparat kurze Zeit in feuchter Luft steht. Für die Bestimmung des Drehungsvermögens diente eine Lösung in trockenem Methylalkohol.

I. 0,3016 g Substanz in 7,8558 g Methylalkohol bei gewöhnlicher Temperatur gelöst. Drehung im 1-Dezimeterrohr bei 20° und Natriumlicht 1,14° nach links. Spezifisches Gewicht der Lösung 0,8113.

Die Drehung war nach einer Stunde unverändert.

II. 0,830 g Substanz in 13,71 g Methylalkohol. Drehung bei 20° im 2-Dezimeterrohr 3,61° nach links. Spezifisches Gewicht 0,8230.

	I.	II.
Mithin $[\alpha]_D^{20°}$ =	$-38,0°$	$-38,4°$.

In wässeriger Lösung ist die spezifische Drehung annähernd ebenso groß, aber sie ändert sich, höchstwahrscheinlich weil teilweise Verseifung erfolgt. Gefunden wurde nämlich:

10 Minuten nach der Auflösung $[\alpha]_D^{20°}$	$-39,2°$
25 „ „ „ „ „	$-40,9°$
1¾ Stunden „ „ „ „	$-43,7°$
5¾ „ „ „ „ „	$-44,2°$

Zur Bereitung des freien Cystin-dimethylesters löst man das Salz in wenig Methylalkohol in der Kälte, versetzt mit der für das Chlor berechneten Menge einer 2-prozentigen Auflösung von Natriummethylat in Methylalkohol und fügt dann sofort zur Fällung des Natriumchlorid das doppelte Volumen trockenen Äthers hinzu. Die filtrierte Flüssigkeit hinterläßt beim Verdampfen unter stark vermindertem Druck den Cystin-dimethylester als schwach gelben Sirup. Zur Reinigung wird er in Äther gelöst, wobei eine amorphe gefärbte Masse zurückbleibt, und die Lösung im Vakuum verdunstet. Der so erhaltene Ester ist farblos, reagiert alkalisch und löst sich leicht in Wasser und Alkohol, ziemlich leicht in Äther, aber sehr schwer in Petroläther. Er gleicht in diesen Eigenschaften den Estern der gewöhnlichen Aminosäuren. Beim Aufbewahren im geschlossenen Gefäß, auch bei Abschluß der Luft färbt er sich schon nach 1—2 Tagen allmählich gelb, später gelbrot, und entwickelt etwas Ammoniak. Viel rascher erfolgt dieselbe Veränderung in der Wärme. Beim starken Abkühlen, z. B. in flüssiger Luft, erstarrt der Ester, aber ohne deutliche Kristallbildung.

Beim Erhitzen der wässerigen Lösung zersetzt er sich unter Abscheidung eines Öls, das gleichzeitig gelbbraun wird. Ob dabei Cystin gebildet wird, haben wir nicht geprüft. Jedenfalls ist die Verseifung keineswegs so glatt wie bei den gewöhnlichen Aminosäuren. Sehr leicht erfolgt aber die Verseifung des Esters durch Alkalien. Löst man ihn z. B. in kaltem Wasser, fügt in mäßigem Überschuß Natronlauge zu und übersättigt nach fünf Minuten langem Stehen mit Essigsäure, so fällt eine große Menge Cystin aus.

Außer dem Hydrochlorat haben wir Nitrat, Sulfat und Oxalat kristallinisch erhalten. Das Nitrat fällt aus der ätherischen Lösung des Esters auf Zusatz von starker Salpetersäure erst als Sirup, erstarrt aber bald. In warmem Methylalkohol ist es leicht löslich. Fügt man zu dieser Lösung Äther bis zur Trübung, so scheidet sich das Salz zumal beim Abkühlen in farblosen, mikroskopischen Kristallen ab, die meist spießartig ausgebildet, und öfters sternförmig verwachsen sind. Das Sulfat wird in ähnlicher Weise erhalten. Es ist in heißem Methylalkohol ziemlich schwer löslich und scheidet sich aus der eingeengten Lösung als weiße Masse ab, in der man unter dem Mikroskop hauptsächlich kuglige Aggregate von äußerst feinen Kriställchen sieht.

Das Oxalat ist im Gegensatz zu den vorhergenannten Salzen in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich. Fügt man also zu der konzentrierten wässerigen Lösung der Base eine starke wässerige Lösung von Oxalsäure, so fällt nach einiger Zeit, besonders beim Reiben, das Salz als weiße kristallinische Masse, die aus mikroskopischen Nadeln oder Prismen besteht.

Bringt man den Ester in alkoholischer Lösung mit Pikrinsäure zusammen und fügt Äther hinzu, so fällt nach einiger Zeit das Pikrat in sehr kleinen, gelben, spitzen Kriställchen, die aber meist zu dichten kugeligen Aggregaten von undeutlich kristallinischem Gefüge vereinigt sind.

Phosphorwolframsäure erzeugt in der sauren wässerigen Lösung des Esters einen dichten weißen Niederschlag, der in überschüssigen Mineralsäuren nicht löslich ist und beim Kochen der Flüssigkeit schmilzt.

Vergleich des Cystins aus Roßhaar und aus Stein.

Das Haarcystin war in der üblichen Weise durch Hydrolyse mit Salzsäure dargestellt und sorgfältig nicht allein von Tyrosin, sondern auch von racemischem Cystin befreit. Das Cystin aus Stein wurde durch Lösen in Ammoniak und durch Fällen mit Essigsäure oder auch durch Verdunsten der ammoniakalischen Lösung kristallisiert. In allen Fällen erhielten wir nur die bekannten charakteristischen, mikroskopischen, sechsseitigen Formen, aber keine Nadeln, und das Präparat aus Stein gab auch mit Millon's Reagens nicht die rote Färbung des Tyrosins. Dieselbe Übereinstimmung zeigte die optische Untersuchung.

I. 0,3172 g Haarcystin in 11,9228 g Normal-Salzsäure gelöst. Spezifisches Gewicht der Lösung 1,029. Drehung bei 20° und Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr 11,84° nach links.

II. 0,3176 g Steincystin in 16,3975 g Normal-Salzsäure gelöst. Spezifisches Gewicht der Lösung 1,024. Drehung bei 20° und Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr 8,70° nach links.

	Haarcystin	Steincystin
$[\alpha]_D^{20°}$	—221,9	—223,6

Diese Zahlen stimmen mit dem Wert[1]) von Mörner 223 bis 224,3° ziemlich gut überein. Die kleine Differenz könnte durch die Temperatur und die verschiedene Konzentration der Salzsäure bedingt sein.

Eine ähnliche Übereinstimmung zeigte sich bei dem salzsauren Dimethylester. Das Präparat aus Cystinstein wurde genau so dargestellt, wie es für Haarcystin vorher beschrieben ist. Der Schmelz- und Zersetzungspunkt war genau derselbe wie bei dem Präparate aus Haarcystin. Ebenso gab die optische Untersuchung eine befriedigende Übereinstimmung.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 604 und **34**, 207.

0,147 g salzsaurer Dimethylester aus Steincystin war gelöst in 3,9953 g Methylalkohol. Die Lösung hatte bei 20° das spezifische Gewicht 0,8116 und drehte in 1-Dezimeterrohr 1,07° nach links.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D^{20^\circ} = -37{,}2^\circ,$$

während für das Präparat aus Haarcystin —38,0° gefunden war (s. oben).

Nach diesen Beobachtungen können wir nicht daran zweifeln, daß die von uns untersuchten Präparate aus Roßhaar und aus Stein identisch sind. Zum gleichen Schluß ist kürzlich Rothera gelangt[1]). Er fand ebenfalls für Cystin aus Stein und Haar im Aussehen der Kristalle, im physiologischen Verhalten und in der spezifischen Drehung der salzsauren Lösung keinen Unterschied. Leider sind aber seine Angaben über die spezifische Drehung nicht ganz einwandfrei. Wir wollen davon absehen, daß die Berechnung seiner Werte eine doppelt so große spezifische Drehung ergibt, als die von ihm mitgeteilte Zahl, weil hier wahrscheinlich ein Druckfehler vorliegt. Aber die von ihm angegebene spezifische Drehung der salzsauren Lösung

$$[\alpha]_D = -252{,}2^\circ \text{ für Steincystin}$$
$$-251{,}1^\circ \text{ für Haarcystin}$$

weicht erheblich ab von dem Werte, den K. A. H. Mörner festgestellt hat, und den wir bestätigen konnten. Ob das an dem Präparate Rotheras oder der Konzentration der Salzsäure oder an der Ausführung der Beobachtung liegt, entzieht sich unserem Urteile.

Was nun die Beobachtungen von Neuberg und Mayer[2]) betrifft, so haben sie zum Schlusse geführt, daß manche Cystinsteine neben Proteïncystin in wechselnden Verhältnissen eine isomere Verbindung enthalten, die in Nadeln kristallisiert, eine geringere spezifische Drehung (in salzsaurer Lösung —206°), andere Löslichkeitsverhältnisse besitzt und auch Derivate von abweichenden Eigenschaften liefert. Obschon es bei den bestimmten und ausführlichen Angaben der Herren Neuberg und Mayer sehr gewagt erscheinen muß, die Existenz dieser Verbindung in Zweifel zu stellen, wenn man nicht Gelegenheit gehabt hat, eine ganze Reihe von Cystinsteinen zu untersuchen, so glauben wir doch eine Beobachtung anführen zu müssen, die für die Beurteilung der Frage nicht ganz gleichgültig sein dürfte. Von Herrn Prof. Gabriel erhielten wir eine kleine Probe des Steincystins, das ihm Herr Neuberg zum Vergleich mit dem synthetisch bereiteten Isocystin übergeben hat, und das zum Teil aus den als charakteristisch angesehenen

---

[1]) C. H. Rothera, Journal of Physiology 32, 177.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 472.

Nadeln besteht[1]). Dieses Präparat zeigt nun, wie wir gefunden haben, mit Millon's Reagens eine starke Rotfärbung, wie sie dem Tyrosin eigentümlich ist, dem reinen gewöhnlichen Cystin aber gänzlich fehlt. Wir halten es deshalb für sehr wahrscheinlich, daß es außer Cystin auch Tyrosin enthält, obschon die geringe Menge des uns zur Verfügung stehenden Materials eine Isolierung des letzteren nicht gestattete.

Über das Vorkommen von Tyrosin in Cystinsteinen liegt unseres Wissens bisher keine Beobachtung vor, und wir sind auch weit davon entfernt, für alle Cystinsteine einen solchen Gehalt anzunehmen, denn der einzige Stein, den wir untersuchen konnten, gibt Millon's Reaktion gar nicht. Er gehört aber auch nach den Kristallisationsproben zu den Steinen, die nach Neuberg und Mayer nur aus „Proteïncystin“ bestehen. Dagegen vermuten wir, daß Millons Probe positiv ausfallen wird bei den Präparaten, die das in Nadeln kristallisierende sog. Steincystin enthalten, und wir können uns nicht verhehlen, daß ein etwaiger Tyrosingehalt in den Präparaten der Herren Neuberg und Mayer manche Beobachtungen dieser Herren auch ohne die Annahme eines besonderen „Steincystins“ erklären würde.

Was endlich das gleichzeitige Auftreten von Cystin und Tyrosin im Harn betrifft, so freuen wir uns, eine Erfahrung der Herren Abderhalden und Schittenhelm mit deren Erlaubnis hier anführen zu können, die als Bestätigung unserer Beobachtung gelten kann. Sie fanden nämlich in dem Harn eines Cystinurikers eine erhebliche Menge von Tyrosin.

[1]) Neuberg und Mayer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 478, 479.

20. Emil Fischer und Ernest Fourneau: Über einige Derivate des Glykocolls.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **34**, 2868 [1901].
(Eingegangen am 10. August.)

Der Gedanke, die aus den Proteïnstoffen durch Hydrolyse entstehenden Aminosäuren durch Anhydridbildung wieder zu größeren Komplexen zu vereinigen, ist schon seit längerer Zeit von verschiedenen Forschern experimentell behandelt worden. Wir erinnern nur an die Anhydride der Asparaginsäure von Schaal[1]), ihre Verwandlung einerseits in den kolloidalen Polyasparaginharnstoff von Grimaux[2]), andererseits in die Polyaspartsäuren von H. Schiff[3]), ferner an die Versuche von Schützenberger[4]) über die Vereinigung verschiedener Aminosäuren (Leucine und Leuceïne) mit Harnstoff durch Erhitzen mit Phosphorsäureanhydrid, an die ähnlichen Beobachtungen Lilienfelds[5]) über die Wirkung von Kaliumbisulfat, Formaldehyd und anderen Kondensationsmitteln auf ein Gemisch von Aminosäureestern und endlich an die Angaben von Balbiano und Frasciatti[6]) über die Verwandlung des Glykocolls in ein hornartiges Anhydrid durch Erhitzen mit Glycerin. Aber alle von ihnen beschriebenen Produkte sind amorphe, schwer charakterisierbare Substanzen, über deren Struktur man ebensowenig wie über den Grad ihrer Verwandtschaft mit den natürlichen Proteïnstoffen etwas sagen kann.

Will man auf diesem schwierigen Gebiete zu sicheren Resultaten kommen, so wird man zuerst eine Methode finden müssen, welche es gestattet, successive und mit definierbaren Zwischenstufen die Moleküle verschiedener Aminosäuren anhydridartig aneinander zu reihen.

---

1) Ann. d. Chem. **157**, 24 [1871].
2) Bull. soc. chim. **38**, 64 [1882].
3) Ann. d. Chem. **303**, 183 [1898] u. **307**, 231 [1899].
4) Recherches sur la synthèse des matières albuminoides et protéiques. Compt. rend. **106**, 1407 [1888] und Compt. rend. **112**, 198 [1891].
5) Dubois' Archiv 1894, S. 383 u. 555.
6) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2323 [1900] u. **34**, 1501 [1901].

Von diesem Gesichtspunkt dürften die folgenden Beobachtungen einiges Interesse beanspruchen, welche wir als einen solchen, zwar noch recht unvollkommenen Versuch der systematischen Verkettung von Aminosäuren betrachten.

Bekanntlich lassen sich die α-Aminosäuren in kristallisierende dimolekulare Anhydride verwandeln, welche man jetzt gewöhnlich Diacipiperazine nennt, und von denen das sogenannte Leucinimid der älteste Repräsentant ist. Wie der eine von uns kürzlich[1]) gezeigt hat, werden diese Produkte am leichtesten aus den Estern der Aminosäuren gewonnen. Das einfachste Glied der Reihe, das von Curtius und Goebel[2]) näher untersuchte Glycinanhydrid, bildet den Ausgangspunkt unserer Beobachtungen.

Wird dasselbe nämlich mit konzentrierter Salzsäure kurze Zeit gekocht, so findet eine Aufspaltung des Piperazinringes statt, und es entsteht das Hydrochlorat einer Aminosäure von der Formel $C_4H_8N_2O_3$. Wir interpretieren den Vorgang auf folgende Art:

$$\begin{array}{l} NH.CH_2.CO \\ \dot{C}O.CH_2.\dot{N}H + H_2O = NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH. \end{array}$$

Die Verbindung ist mithin das erste Anhydrid des Glykocolls und würde also der Stammvater des längst bekannten Hippurylglycins[3]) sein. Da sie der Ausgangspunkt für mehrere kompliziertere Körper ist, so scheint uns die Wahl eines kurzen Namens zweckmäßig. Für die Ableitung eines solchen ist das Wort Glykocoll wenig geeignet. Wir greifen deshalb auf den ebenfalls gebräuchlichen Namen Glycin zurück, nennen das Radikal $NH_2.CH_2.CO.$ „Glycyl" und leiten davon für obige Verbindung den Namen Glycylglycin ab.

Ebenso leicht wie die freie Aminosäure läßt sich ihr Ester $NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$ aus dem Glycinanhydrid durch Kochen mit alkoholischer Salzsäure bereiten.

Sowohl die Säure wie ihr Ester haben starke Neigung, in das Glycinanhydrid zurückzugehen. Ferner sind sie durch große Reaktionsfähigkeit der NH_2-Gruppe ausgezeichnet. So haben wir durch Einwirkung von Phenylisocyanat in alkalischer Lösung aus beiden die Verbindung $C_6H_5.NH.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$ erhalten. Ebenso leicht ließ sich der Ester bei Gegenwart von Soda mit Chlorkohlensäureester kombinieren, wobei die Verbindung $C_2H_5O.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOC_2H_5$ entsteht, welche wir Carbäthoxylglycyl-

---

1) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 435 [1901]. (*S. 175.*)
2) Journ. für prakt. Chem. [2] **37**, 173 [1888].
3) Curtius, Journ. für prakt. Chem. [2] **26**, 175 [1882].

glycinester nennen. Wird letztere mit Ammoniak behandelt, so resultiert ein Körper $C_7H_3N_3O_4$, der wahrscheinlich die Struktur $NH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$ hat und deshalb Carbamidoglycylglycinester genannt werden soll. Er gibt ähnlich dem Biuret mit Natronlauge und Kupfersalzen eine schöne rotviolette Färbung und erinnert dadurch an eine von Curtius und Goebel unter dem Namen „Biuretbase" beschriebene Verbindung.

Wir werden versuchen, auf ähnliche Art noch längere Ketten aus Glykocoll und Harnstoffresten zusammenzusetzen und auch andere Aminosäuren für diese Kombination zu verwenden.

Ähnlich dem Glycinanhydrid kann auch das Alaninanhydrid durch Kochen mit alkoholischer Salzsäure in ein neues Produkt verwandelt werden, welches aller Wahrscheinlichkeit nach das Analogon des Glycylglycinesters ist, und wir hoffen, auf die gleiche Art aus der Mehrzahl der α-Aminosäuren ähnliche Produkte gewinnen zu können.

Glycinanhydrid (Diacipiperazin).

Die Notwendigkeit, größere Mengen des Anhydrids darzustellen, hat uns veranlaßt, das Verfahren von Curtius und Goebel, welche entweder den Glycinester in der 4-fachen Menge Wasser lösen oder das Hydrochlorat in wässeriger Lösung mit Silberoxyd versetzen, etwas abzuändern. Wir bevorzugen die Anwendung des freien Esters, welcher aus dem Hydrochlorat durch Alkali leicht zu gewinnen ist[1]).

100 g Glycinester werden unter Abkühlen mit 60 g Wasser versetzt und das Gemisch bei Zimmertemperatur 1—2 Tage aufbewahrt. Dabei fällt das Anhydrid als schön kristallisierte Masse aus. Es wird abfiltriert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute beträgt ungefähr 37 g oder 67% der Theorie.

Das Anhydrid ist eine so schwache Base, daß seine Salze schon durch Wasser oder Alkohol zerlegt werden. Löst man es z. B. in wenig kalter rauchender Salzsäure und fügt dann Alkohol hinzu, so wird das Anhydrid selbst ausgefällt. Curtius und Goebel haben allerdings ein Chloroplatinat dargestellt und analysiert, aber auch dieses Salz wird, wie wir beobachteten, schon durch Wasser zerlegt. Dieselben Forscher glaubten auch, ein beständiges Hydrochlorat durch Kochen mit starker Salzsäure erhalten zu haben, von dem sie allerdings keine Analyse angaben. Wir haben aber gefunden, daß dieses gegen Wasser beständige

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 34, 436 [1901]. (*S. 177.*) Bei Verarbeitung größerer Mengen beträgt die Ausbeute etwa 80% der Theorie.

Salz kein Derivat des Glycinanhydrids, sondern das Hydrochlorat des Glycylglycins ist.

Glycylglycin, $NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$.

Das Glycinanhydrid löst sich in kalter Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 und läßt sich aus dieser Lösung sowohl durch Fällen mit Alkohol wie auch durch rasches Verdunsten im Vakuum unverändert zurückgewinnen. Bleibt aber die salzsaure Lösung mehrere Tage bei Zimmertemperatur stehen, so fällt das Hydrochlorat des Glycylglycins in häufig zentimetergroßen Kristallen aus. Ungleich rascher erfolgt die Umwandlung beim Erhitzen.

Für die Darstellung des Glycylglycins wird deshalb das fein gepulverte Glycinanhydrid mit der sechsfachen Gewichtsmenge rauchender Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) schnell bis zum Sieden erhitzt und etwa eine Minute im Sieden erhalten, wobei völlige Lösung erfolgen muß. Beim raschen Abkühlen scheidet sich alsbald das Hydrochlorat des Glycylglycins als dicker Brei von feinen Nadeln aus. Die Mutterlauge wird abermals eine Minute gekocht und gibt dann beim Abkühlen eine zweite Kristallisation. Die Ausbeute betrug meist 88% der Theorie.

Wie der Versuch zeigt, ist das Salz in starker Salzsäure recht schwer löslich, dagegen wird es recht leicht von reinem Wasser aufgenommen. In Alkohol ist es selbst beim Erwärmen ziemlich schwer löslich. Zur Analyse war es aus heißem, 95-prozentigem Alkohol umkristallisiert und bei 70° getrocknet. Die Werte passen am besten auf die Formel des neutralen salzsauren Glycylglycins + 1 Molekül Wasser.

0,2004 g Sbst.: 0,1901 g CO_2, 0,1081 g H_2O. — 0,2093 g Sbst.: 27,7 ccm N (20°, 746 mm). — 0,2190 g Sbst.: 0,1686 g AgCl.

$C_4H_8O_3N_2$, $HCl + H_2O$.	Ber.	C 25,73,	H 5,90,	N 15,01,	Cl 19,03.
	Gef.	„ 25,86,	„ 5,99,	„ 14,85,	„ 19,09.

Die Bestimmung des Kristallwassers, welches zwar bei 110° schon entweicht, aber selbst nach 5-stündigem Erhitzen auf diese Temperatur noch nicht vollständig ausgetrieben war, ist nicht endgültig durchgeführt.

Die Überführung des Salzes in die freie Aminosäure kann durch die berechnete Menge Alkali in konzentrierter, wässeriger Lösung geschehen, aber besser wird die Ausbeute bei Anwendung von Silberoxyd. Man löst zu dem Zwecke 1 Teil des Salzes in 25 Teilen kaltem Wasser, fügt 0,8 Teile fein gepulvertes Silberoxyd (wenig mehr als die berechnete Menge) hinzu, schüttelt kräftig, bis alles Chlor gefällt ist,

filtriert und zieht das Chlorsilber noch mit lauwarmem Wasser aus. Die vereinigten wässerigen Filtrate werden mit Schwefelwasserstoff vom Silber befreit, auf dem Wasserbade auf ungefähr $^1/_5$ Volumen eingedampft und in der Hitze mit Alkohol bis zur Trübung versetzt. Beim Abkühlen scheidet sich das Glycylglycin in perlmutterglänzenden Blättchen ab, welche für die Analyse abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 100⁰ getrocknet wurden.

0,1849 g Sbst.: 0,2478 g CO_2, 0,1012 g H_2O. — 0,1164 g Sbst.: 21,0 ccm N (15⁰, 772 mm).

$C_4H_8O_3N_2$.	Ber. C 36,36,	H 6,06,	N 21,21.
	Gef „ 36,55,	„ 6,08,	„ 21,45.

Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr zersetzt sich die Substanz, ohne zu schmelzen, zwischen 215⁰ und 220⁰, nachdem sie sich schon vorher dunkel gefärbt hat.

Sie löst sich in heißem Wasser leicht, in kaltem erheblich schwerer, aber doch merklich mehr als das Glycinanhydrid. In Alkohol ist sie sehr schwer, in Äther gar nicht löslich. Mit Salzsäure bildet sie das ursprüngliche Hydrochlorat. Die Aminosäure löst gefälltes Kupferoxyd in wässeriger Suspension beim Erwärmen sofort und bildet eine tiefblaue Flüssigkeit. Beim Eindampfen scheidet sich das Kupfersalz als tiefblaue, aus kleinen Prismen bestehende Kristallmasse ab, welche selbst in kaltem Wasser leicht löslich ist. An diesem Verhalten gegen Kupferoxyd kann das Glycylglycin leicht von dem Glycinanhydrid unterschieden werden. Denn kocht man die wässerige Lösung des letzteren mit gefälltem Kupferoxyd etwa $^1/_2$ Minute, so ist das Filtrat kaum gefärbt.

Glycylglycinester, $NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$.

Suspendiert man 10 g sehr fein gepulvertes Glycinanhydrid in 270 ccm absolutem Alkohol, sättigt unter Kühlung mit Salzsäuregas und erwärmt dann rasch auf dem Wasserbade zum Sieden, so findet beim häufigen Umschütteln bald klare Lösung statt. Man kühlt jetzt sofort ab, wobei alsbald die Kristallisation des salzsauren Glycylglycinesters in feinen, glänzenden Nadeln beginnt. Nach einstündigem Stehen bei 0⁰ wird die Kristallmasse abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und über Natronkalk getrocknet. Die Ausbeute beträgt unter den angegebenen Bedingungen etwa 80% der Theorie. Wird dagegen das Kochen mit der salzsauren Lösung länger als nötig fortgesetzt, so treten Verluste durch weitere Aufspaltung des Glycylglycinesters ein, und beim langen Kochen entstehen so große Mengen Glykocollester, daß sein Hydrochlorat beim Erkalten mit ausfällt.

Der salzsaure Glycylglycinester schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 182° (korr.) unter Zersetzung. Er ist in Wasser leicht, in kochendem Alkohol ziemlich leicht und in kaltem Alkohol recht schwer löslich. Für die Analyse war er aus heißem Alkohol umkristallisiert und bei 100° getrocknet.

0,1307 g Sbst.: 0,1747 g CO_2, 0,0776 g H_2O. — 0,1987 g Sbst.: 24,4 ccm N (13,5°, 760 mm).

$C_6H_{12}O_3N_2$, HCl. Ber. C 36,64, H 6,61, N 14,24.
Gef. „ 36,45, „ 6,60, „ 14,51.

Dasselbe Salz entsteht aus dem Glycylglycin beim Erwärmen mit alkoholischer Salzsäure.

Zur Darstellung des freien Esters werden 14 g des gepulverten Hydrochlorats mit 10 ccm Wasser und 30 ccm Chloroform übergossen und zu dem stark gekühlten Gemisch allmählich unter heftigem Schütteln 7 ccm Natronlauge (2,8 g Natriumhydroxyd enthaltend) zugegeben. Schließlich fügt man einen Überschuß von trocknem Kaliumcarbonat hinzu, um den Ester möglichst auszusalzen und gleichzeitig das Chloroform von den suspendierten Wasserteilchen zu scheiden. Die Chloroformlösung wird abgegossen und der Rückstand noch dreimal mit der gleichen Menge ausgelaugt. Die vereinigten Chloroformauszüge werden mit Natriumsulfat getrocknet, auf etwa 15 ccm eingedampft und mit etwa 80 ccm Petroläther versetzt. Dabei scheidet sich der Glycylglycinester in feinen Nadeln ab, welche durch abermaliges Lösen in Chloroform und Ausfällen mit Petroläther leicht zu reinigen sind. Die Ausbeute betrug 9 g oder 78% der Theorie. Der Verlust ist hier wie in ähnlichen Fällen durch die große Löslichkeit und Unbeständigkeit des Esters bedingt.

Für die Analyse war das Präparat mit Äther gewaschen und im Vakuum über Ätzkali getrocknet.

0,2860 g Sbst.: 0,4704 g CO_2, 0,1860 g H_2O. — 0,2015 g Sbst.: 30,6 ccm N (14°, 754 mm).

$C_6H_{12}O_3N_2$. Ber. C 45,00, H 7,5, N 17,50.
Gef. „ 44,86, „ 7,2, „ 17,72.

Der Ester schmilzt bei 88—89° (korr.). Er löst sich sehr leicht in Wasser mit stark alkalischer Reaktion. In Chloroform und Alkohol ist er ebenfalls sehr leicht, in Aceton etwas schwerer und in Äther recht schwer löslich.

Der Ester ist ausgezeichnet durch die Neigung, sich durch Alkoholabspaltung in Glycinanhydrid zurückzuverwandeln. Das tritt z. B. ein, wenn die wässerige Lösung bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird. Schon nach $^1/_2$ Stunde ist der größte Teil des Esters zersetzt,

und wenn die Lösung nicht zu verdünnt war, hat sich eine reichliche Menge Glycinanhydrid abgeschieden.

Noch leichter wird der Ester durch alkoholisches Ammoniak zerlegt. Löst man 0,5 g Ester in 5 ccm Alkohol, der bei 0^0 mit Ammoniak gesättigt ist, so beginnt nach wenigen Augenblicken schon die Kristallisation des Glycinanhydrids, welches bald die Flüssigkeit breiartig erfüllt. Seine Menge entsprach ungefähr 90% der Theorie, und die Reinheit des Produktes wurde durch eine Stickstoffbestimmung kontrolliert.

Ber. N 24,56. Gef. N 24,37.

Ähnlich dem Ammoniak wirkt Natriumäthylat in alkoholischer Lösung auf den Glycylglycinester.

Auch durch bloßes Erhitzen läßt sich die Verwandlung in Glycinanhydrid herbeiführen. Erwärmt man den geschmolzenen Ester rasch auf höhere Temperatur, so beginnt gegen 190^0 eine Gasentwickelung, und es bildet sich ein weißes, kristallinisches Produkt, welches, neben viel Glycinanhydrid, auch in kleiner Menge einen Körper enthält, welcher mit Alkali und Kupfersalzen die Biuretfärbung gibt und wahrscheinlich mit der „Biuretbase" von Curtius und Goebel identisch ist.

Selbst beim Aufbewahren im trocknen Zustande verändert sich der Ester schon verhältnismäßig rasch, was man leicht durch die Löslichkeit in Chloroform oder Alkohol verfolgen kann. So war ein Präparat, welches 10 Tage bei etwa 25^0 gestanden hatte, in Chloroform ganz unlöslich geworden, gab dann mit Alkali und Kupfersalzen die Biuretfärbung, bestand aber zum größten Teil aus Glycinanhydrid, welches durch Umkristallisieren aus Wasser leicht gereinigt werden konnte.

Die große Empfindlichkeit des Esters wird durch Substitution in der Aminogruppe beseitigt, denn die folgenden Derivate sind relativ recht beständige Produkte.

Phenylcyanat-Glycylglycin,

$C_6H_5.NH.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$.

Löst man 0,80 g Glycylglycinester in 2 ccm Wasser und 5 ccm Normal-Natronlauge, welche auf 0^0 abgekühlt sind, fügt dann auf einmal 0,6 g Phenylisocyanat zu und schüttelt heftig, so scheidet sich nach wenigen Sekunden das Natriumsalz des Phenylcyanatglycylglycins als dichter Kristallbrei ab. Gleichzeitig mit der Anlagerung des Phenylisocyanats findet also auch eine Verseifung des Esters statt.

Wird der Kristallbrei wieder durch Erwärmen unter Zusatz von etwas Wasser gelöst und die filtrierte Flüssigkeit mit verdünnter Essigsäure angesäuert, so scheidet sich das Phenylcyanatglycylglycin in feinen Nadeln ab, deren Menge mehr als 90% der Theorie beträgt. Aus wenig kochendem Wasser umkristallisiert, bildet es feine seidenglänzende Nadeln, welche für die Analyse bei 90° getrocknet wurden.

0,1827 g Sbst.: 0,3525 g CO_2, 0,0861 g H_2O. — 0,1906 g Sbst.: 25,8 ccm N (15°, 768 mm).

$C_{11}H_{13}O_4N_3$. Ber. C 52,59, H 5,13, N 16,73.
Gef. „ 52,51, „ 5,23, „ 16,03.

Die Verbindung schmilzt unter Zersetzung gegen 175° (korr.). Sie löst sich in heißem Alkohol ziemlich leicht, dagegen äußerst schwer in Äther. In verdünnter Natronlauge ist sie ziemlich leicht löslich, konzentrierte Lauge fällt aber das Natriumsalz. Die alkalische Lösung gibt nicht die Biuretreaktion.

Für die Darstellung der Verbindung kann man statt des Glycylglycinesters auch sein Hydrochlorat benutzen, nur muß dann die Menge des Alkalis doppelt so groß genommen werden. Da die Ausbeute auch hier fast theoretisch ist, so wird man diesen Weg für die praktische Darstellung vorziehen.

Durch Kochen mit Alkohol und Schwefelsäure wird die Verbindung leicht verestert. Erhitzt man 6 g derselben mit 18 g absolutem Alkohol und 2 g konzentrierter Schwefelsäure $^1/_2$ Stunde zum Sieden, so scheidet sich ein Teil des Esters schon in der Hitze kristallinisch aus. Eine weitere Menge erhält man durch Verdampfen des Alkohols im Vakuum und Verdünnen mit Wasser. Die Ausbeute betrug 55% der Theorie. Der Ester wurde durch Umkristallisieren aus der 20-fachen Menge heißen Wassers gereinigt und für die Analyse bei 100° getrocknet.

0,3024 g Sbst.: 0,6182 g CO_2, 0,1668 g H_2O. — 0,2080 g Sbst.: 26,9 ccm N (15°, 752 mm).

$C_{13}H_{17}O_4N_3$. Ber. C 55,91, H 6,09, N 15,05.
Gef. „ 55,75, „ 6,12, „ 15,00.

Schmp. 165—166°. In heißem Alkohol leicht, in kochendem Chloroform oder Toluol schwer und in Äther sehr schwer löslich.

Carbäthoxyl-Glycylglycinester,

$C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$.

5 g Glycylglycinester wurden in 20 g Wasser von Zimmertemperatur durch Schütteln rasch gelöst, nach dem Abkühlen in Eiswasser mit 4,25 g Chlorkohlensäureester ($1^1/_4$ Mol.) versetzt und dann unter

fortwährendem, kräftigem Schütteln 2,3 g Natriumcarbonat, welches zuvor in 20 ccm warmem Wasser gelöst und dann abgekühlt ist, in drei Portionen zugefügt. Die Menge des Natriumcarbonats reicht gerade aus, um alles Halogen des Chlorkohlensäureesters zu binden. Während der Operation fällt der Carbäthoxylglycylglycinester als dicker Kristallbrei aus, welcher abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen wird. Die Mutterlauge wird zur Gewinnung des in Lösung gebliebenen Teiles mit Chloroform ausgeschüttelt. Zur Reinigung löst man das Produkt in etwa 11 Teilen heißem Essigester und fällt mit Petroläther. Die Ausbeute beträgt durchschnittlich 80% der Theorie.

An Stelle des Glycylglycinesters kann auch sein Hydrochlorat als Ausgangsmaterial dienen.

Man löst dann 6,12 g des Salzes, welche den obigen 5 g Ester entsprechen, in 17 ccm Wasser, gibt unter guter Kühlung erst zur Neutralisation der Salzsäure 3,1 ccm 10-fach normaler Natronlauge zu und verfährt dann wie oben. Da die Ausbeute ebensogut ist und die Isolierung des Glycylglycinesters überflüssig wird, so ist dieses letztere Verfahren praktisch vorzuziehen.

Für die Analyse diente ein im Vakuum über Schwefelsäure getrocknetes Präparat.

0,1927 g Sbst.: 0,3269 g CO_2, 0,1212 g H_2O. — 0,1653 g Sbst.: 17,6 ccm N (24°, 768 mm).

$C_9H_{16}O_5N_2$. Ber. C 46,55, H 6,89, N 12,07.
Gef. „ 46,26, „ 6,99, „ 12,08.

Die Verbindung ist in heißem Wasser sehr leicht löslich und scheidet sich beim Erkalten bei genügender Konzentration in farblosen, häufig zu Büscheln vereinigten Spießen ab. Da sie aber in kaltem Wasser noch in beträchtlicher Menge löslich ist, so bringt jede solche Kristallisation erhebliche Verluste. Von heißem Alkohol, Aceton und Benzol wird sie ebenfalls leicht und dann successive immer schwerer von Essigester, Äther und Petroläther aufgenommen. Aus heißem Essigester kristallisiert sie in flachen Prismen oder Spießen. Schmp. 87° (korr.). Mit Alkali und Kupfersalzen gibt sie nicht die Biuretfärbung.

Carbamido-Glycylglycinester,

$NH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$ (?).

Die Bildung des Körpers geht besonders glatt vonstatten, wenn der vorhergehende Ester der Wirkung des flüssigen Ammoniaks bei gewöhnlicher Temperatur unterliegt. Die Operation wurde im Einschmelzrohr ausgeführt, und die Menge des Ammoniaks war etwa 4mal

so groß als die des Esters. Dieser löst sich vollkommen farblos, und nach 24-stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur ist die Reaktion beendet. Man läßt nach Öffnen der Kapillare das Ammoniak verdunsten und kristallisiert den festen Rückstand aus heißem Alkohol. Die Ausbeute betrug 88% der Theorie.

Statt des reinen Ammoniaks läßt sich auch seine alkoholische Lösung verwenden. Nur ist dann höhere Temperatur nötig.

Bei 4—5-stündigem Erhitzen des Carbäthoxylglycylglycinesters mit der 20-fachen Menge bei 0⁰ gesättigtem alkoholischen Ammoniak auf 100⁰ betrug die Ausbeute an reinem Produkt 75% der Theorie. Für die Analyse war das aus Alkohol umkristallisierte Präparat im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2003 g Sbst.: 0,3038 g CO_2, 0,1137 g H_2O. — 0,1905 g Sbst.: 35,8 ccm N (26⁰, 751 mm).

$C_7H_{13}O_4N_3$. Ber. C 41,38, H 6,40, N 20,69.
Gef. „ 41,37, „ 6,35, „ 20,85.

Die Verbindung schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 183⁰ (korr.) unter Zersetzung. Sie löst sich in heißem Wasser und Alkohol sehr leicht und kristallisiert aus beiden beim Abkühlen leicht in feinen, meist sechseckigen Blättchen, welche sich fettig anfühlen. In Chloroform, Benzol und Äther schwer löslich.

Die wässerige Lösung gibt auf Zusatz von Natronlauge und wenig Kupfersalz eine schön rotviolette Färbung, welche derjenigen des Biurets sehr ähnlich ist[1]). Sie reduziert ferner eine alkalisch-ammoniakalische Silberlösung beim Erwärmen unter Spiegelbildung.

Die oben angeführte Strukturformel ist zwar nach unserer Meinung wahrscheinlicher als die andere Möglichkeit:

$$CO_2C_2H_5.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2,$$

aber sie bedarf doch noch der experimentellen Begründung. Durch Alkali in kalter, verdünnter, wässeriger Lösung wird der Ester in eine kristallisierende Säure verwandelt. welche in kaltem Wasser schwer löslich ist, gegen 180⁰ unter Zersetzung schmilzt, Carbonate leicht zersetzt und nicht mehr die Biuretfärbung zeigt.

Schwieriger als Ammoniak wirken die Ester der Aminosäuren auf den Carbäthoxylglycylglycinester ein, aber durch längeres Erhitzen des letzteren mit Leucinester auf 130⁰ ist uns doch die Vereinigung gelungen. Unter Alkoholaustritt entsteht ein Produkt vom Schmp. 109

[1]) Bezüglich der Biuretreaktion verschiedener Amine und Harnstoffderivate vergleiche man die ausführlichen Beobachtungen von H. Schiff, Ann. d. Chem. **299**, 236.

bis 110⁰ und der Zusammensetzung $C_{15}H_{27}O_6N_3$, welches ebenfalls die Biuretreaktion zeigt. Die ausführliche Beschreibung bleibt einer späteren Mitteilung vorbehalten.

Das gleiche gilt für den Körper, welcher beim Erwärmen des Alaninanhydrids mit alkoholischer Salzsäure entsteht und zweifelsohne das Analogon des Glycylglycinesters ist.

Schließlich sagen wir Herrn Dr. O. Wolfes für die freundliche Hilfe bei obigen Versuchen besten Dank.

---

21. Emil Fischer: Über einige Derivate des Glykocolls, Alanins und Leucins.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 35, 1095 (1902).
(Eingegangen am 5. März.)

In der ersten Mitteilung[1]) wurde gezeigt, daß der aus dem Glycinanhydrid durch alkoholische Salzsäure entstehende Glycylglycinester, $H_2N.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$, ähnlich den Estern der gewöhnlichen Aminosäuren ein recht reaktionsfähiger Körper ist und sich deshalb vorzüglich zum Aufbau komplizierter Derivate des Glykocolls eignet. Bei dem Interesse, welches diese Synthesen mit Rücksicht auf die Proteïnstoffe bieten, habe ich sie nach verschiedener Richtung fortgesetzt und zunächst einige der früher beschriebenen Produkte näher untersucht.

Bei der Einwirkung von Ammoniak auf den Carboxäthylglycylglycinester wurde ein Produkt gewonnen, welches an Stelle einer Estergruppe die Amidgruppe enthielt, und deshalb vorläufig als der Carbamidoglycylglycinester, $H_2N.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$ bezeichnet wurde, obschon die Gleichberechtigung der Formel $C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$, anerkannt werden mußte. Die weitere Untersuchung hat in der Tat ergeben, daß letztere die richtige ist; denn der wahre Carbamidoglycylglycinester, welcher aus salzsaurem Glycylglycinester und Kaliumcyanat nach der Wöhler'schen Synthese entsteht, ist von dem früheren Produkte ganz verschieden. Für dieses ist mithin auch der Name zu ändern. Ich bezeichne es jetzt als Carboxäthylglycylglycinamid.

Durch vorsichtige Behandlung mit Alkalien läßt sich in der Verbindung die Estergruppe verseifen, und es entsteht die Säure $COOH.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$, die man Glycylglycinamidcarbonsäure nennen kann. Etwas komplizierter liegen die Verhältnisse beim Carboxäthylglycylglycinester selbst. Denn hier führt die Verseifung zunächst zu einer Estersäure und schließlich zu einer zwei-

---

[1]) E. Fischer und E. Fourneau, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2868 [1901]. (*S. 279.*)

basischen Säure. Die Struktur der letzteren, die ich Glycylglycincarbonsäure nenne, ist ohne weiteres klar, für die einbasische Säure bleibt dagegen die Wahl zwischen folgenden beiden Formeln: $C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$ und $COOH.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$. Ich bevorzuge die erstere, denn es ist wahrscheinlich, daß bei der Wirkung des Alkalis zuerst die Estergruppe angegriffen wird, welche auch durch Ammoniak in die Amidgruppe verwandelt wird.

In der ersten Mitteilung ist bereits eine Verbindung $C_{15}H_{27}O_6N_3$ kurz erwähnt, welche aus dem Carboxäthylglycylglycinester durch Erhitzen mit Leucinester entsteht. Da ihre Bildung und ihre Eigenschaften denjenigen des Carboxäthylglycylglycinamids genau entsprechen, so zweifle ich nicht daran, daß sie auch eine ähnliche Struktur hat. Ich gebe ihr deshalb die Formel $C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH(C_4H_9).CO_2C_2H_5$ und den Namen Carboxäthylglycylglycylleucinester. Wie man sieht, sind hier schon 3 Moleküle Aminosäuren anhydridartig verkuppelt, und es ist recht wahrscheinlich, daß man auf diesem Wege fortfahrend schließlich zu Formen gelangen wird, die mit den Peptonen schon manche Ähnlichkeit besitzen. Ein noch komplizierteres Gebilde wurde aus dem Glycylglycinester durch Phosgen erhalten. Es hat die Struktur: $CO(NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5)_2$ und kann als Carbonyldiglycylglycinester bezeichnet werden. Durch Ammoniak entsteht daraus das Carbonyldiglycylglycinamid, und bei der Verseifung mit Alkali liefert der Ester die zugehörige Säure $CO(NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH)_2$, Carbonyldiglycylglycin.

Dieselbe Reaktion, welche vom Glycinanhydrid zum Glycylglycin führt, läßt sich, wie früher schon kurz erwähnt wurde, auch auf die Anhydride der kohlenstoffreicheren Aminosäuren übertragen, aber die Isolierung der Produkte macht hier etwas größere Schwierigkeiten. Genauer untersucht wurde der Vorgang beim Alanin und Leucin.

Das Anhydrid des Alanins wird beim Kochen mit alkoholischer Salzsäure fast ebenso schnell wie das Glycinanhydrid verändert, und es entsteht dabei ein Produkt, das zweifellos dem Glycylglycinester entspricht. Da es aber weder selbst, noch sein Hydrochlorat Neigung zum Kristallisieren hat und außerdem auch sehr leicht in Alaninanhydrid zurückverwandelt wird, so mußte auf seine Analyse verzichtet werden; dagegen gelang es, daraus durch Kombination mit Chlorkohlensäureester den schön kristallisierenden Carboxäthylalanylalaninester, $C_2H_5CO_2.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).CO_2C_2H_5$, zu gewinnen.

Das Anhydrid des Leucins, das sogenannte Leucinimid, bietet der aufspaltenden Wirkung der Säuren einen größeren Widerstand als die kohlenstoffärmeren Diacipiperazine.

Mit Hilfe von rauchendem Bromwasserstoff ist es aber doch möglich gewesen, daraus das Leucylleucin, $NH_2.CH(C_4H_9).CO.NH.CH(C_4H_9).COOH$, in leidlicher Ausbeute zu gewinnen.

Carboxäthylglycylglycin, $C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$ (?).

Diese Säure, deren Struktur im vorhergehenden diskutiert wurde, ist das erste Verseifungsprodukt des Carboxäthylglycylglycinesters. Für ihre Bereitung wurden 5 g Ester in 20 ccm Wasser gelöst, bei gewöhnlicher Temperatur mit 23 ccm Normal-Natronlauge (etwas mehr als 1 Molekül) versetzt, die Flüssigkeit nach einstündigem Stehen mit 23 ccm Normal-Salzsäure vermischt und unter stark vermindertem Druck auf etwa 20 ccm eingedampft. Beim starken Abkühlen fiel die Säure als dicker Kristallbrei aus. Sie wurde abfiltriert und aus wenig warmem Wasser umkristallisiert. Da sie aber noch eine geringe Menge Asche enthielt, so wurde sie nochmals aus heißem Alkohol kristallisiert und für die Analyse im Vakuum getrocknet.

0,1993 g Sbst.: 0,3003 g CO_2, 0,1077 g H_2O. — 0,1400 g Sbst.: 16,5 ccm N (17,5°, 767,5 mm).

$C_7H_{12}O_5N_2$. Ber. C 41,17, H 5,88, N 13,72.
Gef. „ 41,09, „ 6,00, „ 13,75.

Die Säure ist in Wasser, besonders in der Wärme, sehr leicht löslich, viel schwerer wird sie von Alkohol aufgenommen. Sie kristallisiert aus beiden Flüssigkeiten in sehr kleinen, biegsamen Nadeln, welche bei 140° (korr.) schmelzen und sich gegen 200° unter Gasentwickelung und Bräunung zersetzen. Das Kupfersalz ist in Wasser ziemlich leicht löslich und kristallisiert in dünnen, hellgrünen Prismen. Das schwerer lösliche Silbersalz fällt aus der Lösung des Ammoniumsalzes mit Silbernitrat in feinen biegsamen Nadeln aus.

Die Verbindung reagiert sauer und zersetzt Carbonate. Sie reduziert bei Gegenwart von freiem Alkali beim Kochen die ammoniakalische Silberlösung recht stark.

Übrigens tritt diese Reaktion auch bei dem Ester und allen anderen, in dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen ein. Da sie ferner, wenn auch in etwas abgeschwächtem Maße, bei dem Glykocoll beobachtet wurde, so dürfte es sich hier um eine allgemeine Eigenschaft der α-Aminosäuren handeln.

Glycylglycincarbonsäure,
$COOH.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$.

Werden 3 g Carboxäthylglycylglycinester mit 30 ccm Normal-Natronlauge 5 Stunden am Rückflußkühler gekocht, so sind an Stelle von 26 ccm Normal-Alkali, welche sich für 2 Moleküle berechnen, 24,5 ccm verbraucht. Man versetzt nun mit 30 ccm Normal-Salzsäure, um das Alkali ganz zu binden, verdampft auf dem Wasserbade und kocht den Rückstand 2 mal mit je 50 ccm Alkohol aus. Die alkoholische Lösung wird unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand in etwa 15 ccm warmem Wasser gelöst. Beim Abkühlen auf 0° fällt der größte Teil der Säure in feinen, meist sternförmig gruppierten Nadeln aus. Die Mutterlauge gibt nach dem Eindampfen eine zweite, aber viel kleinere Kristallisation. Die Gesamtausbeute betrug 64% der Theorie. Für die Analyse wurde im Vakuum getrocknet.

0,1442 g Sbst.: 0,1869 g CO_2, 0,0613 g H_2O. — 0,1562 g Sbst.: 17,98 ccm $^1/_{10}$ *n*-Ammoniak (Kjeldahl).

$C_5H_8O_5N_2$. Ber. C 34,09, H 4,55, N 15,91.
Gef. „ 34,27, „ 4,58, „ 16,12.

Die Substanz schmilzt bei raschem Erhitzen im Kapillarrohr gegen 208° (korr.) unter stürmischer Gasentwickelung. Sie löst sich in warmem Wasser, erheblich schwerer in Alkohol, in Äther ist sie fast unlöslich.

Das grüne, ziemlich schlecht kristallisierende Kupfersalz ist in Wasser leicht löslich. Das Silbersalz fällt aus der Lösung des Ammoniumsalzes durch Silbernitrat als farbloser, körniger, aber nicht deutlich kristallisierter Niederschlag aus. Es löst sich in überschüssigem Ammoniak leicht auf. Die alkalische Lösung der Säure nimmt kein Kupferhydroxyd auf und gibt mit Fehlingscher Flüssigkeit eine rein blaue Färbung, welche beim Kochen nicht verschwindet.

Glycylglycinamidcarbonsäure,
$COOH.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$.

Sie entsteht aus ihrem Ester, dem Carboxäthylglycylglycinamid, welches in der ersten Mitteilung irrtümlich als Carbamidoglycylglycinester angeführt wurde, durch vorsichtige Verseifung mit Alkali.

5 g des Esters werden in 35 ccm warmem Wasser gelöst, rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt, mit 26 ccm Normal-Natronlauge versetzt und so lange geschüttelt, bis die ausgeschiedenen Kristalle wieder in Lösung gegangen sind. Nach $2^1/_2$-stündigem Stehen wird die Flüssigkeit mit 26 ccm Normal-Salzsäure vermischt, unter stark vermindertem Druck zur Trockne verdampft, das Kochsalz durch Auslaugen mit

wenig eiskaltem Wasser entfernt und der Rückstand zweimal aus wenig warmem Wasser umkristallisiert.

Infolge der großen Löslichkeit traten dabei allerdings erhebliche Verluste ein, so daß die Ausbeute an reiner Säure nur 56% der Theorie betrug.

Für die Analyse wurde sie bei 100° getrocknet.

0,2000 g Sbst.: 0,2515 g CO_2, 0,0930 g H_2O. — 0,2842 g Sbst.: 4,83 ccm Normalsäure (Kjeldahl).

$C_5H_9N_3O_4$. Ber. C 34,29, H 5,14, N 24,00.
Gef. „ 34,30, „ 5,12, „ 23,80.

Die Verbindung schmilzt unter Zersetzung gegen 195° (korr.). Sie löst sich etwa in der gleichen Menge siedendem Wasser und kristallisiert daraus in kleinen, farblosen Blättchen oder flachen Prismen.

In Alkohol, Aceton, Chloroform, Benzol ist sie nur wenig löslich. Die wässerige Lösung reagiert sauer und löst Calciumcarbonat beim Kochen. Mit viel überschüssigem Alkali und Kupfersalzen gibt sie, im Gegensatz zu ihrem Ester, nicht die Färbung des Biurets, sondern eine rein blaue Lösung, welche beim Kochen Kupferoxydul abscheidet.

Carbamidoglycylglycinester,
$NH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$.

Löst man 3 g salzsauren Glycylglycinester in 6 ccm Wasser und fügt 1,25 g reines Kaliumcyanat bei gewöhnlicher Temperatur hinzu, so löst es sich beim Schütteln rasch auf, und nach etwa 10 Minuten beginnt die Kristallisation des neuen Harnstoffderivats. Nach $1^1/_2$-stündigem Stehen wird die Masse auf 0° abgekühlt, dann abgesaugt und zur Entfernung der Mutterlauge scharf abgepreßt. Die Ausbeute an Rohprodukt war recht befriedigend. Zur völligen Reinigung wurde dasselbe zweimal aus je 3 ccm Wasser umkristallisiert und jedesmal abgepreßt.

Da die Substanz in Wasser recht leicht löslich ist, so entstehen hierbei große Verluste, denn die Menge des analysenreinen Präparats betrug nur 1,2 g. Es ist deshalb zweckmäßig, alle wässerigen Mutterlaugen zu verdampfen und den Rückstand mit absolutem Alkohol auszukochen, wobei die Carbamidoverbindung, nur von einer geringen Menge anorganischer Substanz begleitet, in Lösung geht. Für die Analyse war das Präparat im Vakuum getrocknet.

0,2007 g Sbst.: 0,3048 g CO_2, 0,1160 g H_2O. — 0,2741 g Sbst.: 39,57 ccm $^1/_{10}$-Normal-Ammoniak.

$C_7H_{13}O_4N_3$. Ber. C 41,38, H 6,40, N 20,69.
Gef. „ 41,41, „ 6,41, „ 20,21.

Die Substanz schmilzt bei 163° (165° korr.). Sie kristallisiert sowohl aus Wasser wie aus Alkohol in feinen, farblosen, biegsamen Nadeln, die häufig zu kugeligen Aggregaten vereinigt sind. Sie löst sich äußerst leicht in warmem Wasser, dann stufenweise schwerer in Alkohol, Aceton, Chloroform, Benzol, Äther. Sie gibt keine Biuretfärbung und unterscheidet sich dadurch ebenso, wie durch den niedrigeren Schmelzpunkt von dem isomeren Carboxäthylglycylglycinamid.

Einwirkung von Guanidin auf Carboxäthylglycylglycinester.

In der Hoffnung, ein dem Amid entsprechendes Guanidinderivat zu erhalten, wurden 2 g des Esters mit 25 g einer alkoholischen Guanidinlösung, welche 4,85% Base enthielt, in geschlossenem Rohre 15 Stunden auf 100° erhitzt. Die gelbe Lösung schied beim Erkalten eine gelbe kristallinische Masse ab, deren Menge beim Einengen noch größer wurde. Nach einmaligem Umkristallisieren aus heißem Methylalkohol betrug die Ausbeute 1 g. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus der 30-fachen Menge heißen Methylalkohols unter Zusatz von Tierkohle wurden farblose, kurze Prismen erhalten, welche nach dem Trocknen im Vakuum die Zusammensetzung $C_6H_{11}O_4N_5$ zeigten.

0,1948 g Sbst.: 0,2357 g CO_2, 0,0892 g H_2O. — 0,2057 g Sbst.: 47,48 ccm $^1/_{10}$-Normal-Ammoniak.

$C_6H_{11}O_4N_3$. Ber. C 33,18, H 5,07, N 32,26.
Gef. „ 33,04, „ 5,08, „ 32,31.

Die Verbindung, welche bei 224° schmilzt, sich in Wasser leicht löst und alkalisch reagiert, zeigt das Verhalten eines Guanidinsalzes. Denn wenn man ihre wässerige Lösung vorsichtig in der Kälte mit Salzsäure ansäuert und mit Goldchlorid versetzt, so fällt sofort das Aurochlorat des Guanidins aus.

0,2507 g Sbst.: 0,0284 g CO_2, 0,0451 g H_2O. — 0,2362 g Sbst.: 0,1163 g Au.

CH_5N_3, $HAuCl_4$. Ber. C 3,01, H 1,50, Au 49,00.
Gef. „ 3,09, „ 1,99, „ 49,24.

Demnach würde man die Verbindung aufzufassen haben als das Guanidinsalz einer Säure $C_5H_6O_4N_2$, die nach der Formel das Anhydrid der Glycylglycincarbonsäure sein könnte. Es muß aber bemerkt werden, daß die Säure bisher nicht isoliert wurde.

Carboxäthyl-glycyl-glycyl-leucinester,
$C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH(C_4H_9).CO_2C_2H_5$.

Die Wechselwirkung zwischen Carboxäthylglycylglycinester und Leucinester erfolgt erst bei höherer Temperatur und verläuft deshalb keineswegs glatt, denn nebenher entstehen Leucinimid und andere,

amorphe, nicht näher untersuchte Produkte. Die besten Resultate gab folgendes Verfahren: Je 10 g beider Ester werden im geschlossenen Rohr 36 Stunden auf 130—135° erwärmt, dann die Masse vor dem völligen Erkalten mit 100 ccm Äther rasch durchgerührt und das unlösliche Leucinimid, dessen Menge etwa 1,7 g beträgt, sofort abfiltriert. Die braun gefärbte, ätherische Lösung scheidet beim Stehen die neue Verbindung als gelbe, kristallinische Masse ab. Nach 24 Stunden betrug ihre Menge 4,2 g oder 28% der Theorie. Sie wird zuerst aus heißem Essigester umkristallisiert, wobei sie nahezu farblos wird. Zur völligen Reinigung löst man aber schließlich noch in der 20-fachen Menge kochendem Wasser, behandelt mit Tierkohle und läßt in der Kälte kristallisieren. Der Carboxäthylglycylglycylleucinester scheidet sich in schönen, farblosen, meist zu Büscheln verwachsenen Prismen ab, welche für die Analyse im Vakuum getrocknet wurden:

0,1888 g Sbst.: 0,3603 g CO_2, 0,1333 g H_2O. — 0,2512 g Sbst.: 22,00 ccm $^1/_{10}$-Normal-Ammoniak.

$C_{15}H_{27}O_6N_3$. Ber. C 52,18, H 7,82, N 12,18.
Gef. „ 52,04, „ 7,84, „ 12,26.

Da in der Mutterlauge eine erhebliche Menge gelöst bleibt, so empfiehlt es sich, dieselbe unter stark vermindertem Druck einzudampfen.

Der Ester schmilzt bei 109,5° (korr.). Er löst sich in Alkohol und Aceton sehr leicht, von heißem Benzol oder Essigester verlangt er die 4—5-fache Menge. In kalter, wässeriger Lösung gibt er mit Alkali und Kupfersalz recht hübsch die Biuretfärbung und gleicht darin vollkommen dem Carboxäthylglycylglycinamid.

Acetylglycylglycinester,
$CH_3CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$.

Trägt man 1 Teil Glycylglycinester in 2 Teile Essigsäureanhydrid ein, so erwärmt sich das Gemisch, und wenn man zum Schluß noch etwa 5 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt, so ist die Reaktion beendet, obschon keine völlige Lösung eintritt. Zur Entfernung des überschüssigen Essigsäureanhydrids wird mit Alkohol vermischt, auf dem Wasserbade verdampft, diese Operation mehrmals wiederholt und schließlich der Rückstand aus kochendem Alkohol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt etwa 80% der Theorie. Für die Analyse war das Präparat bei 100° getrocknet:

0,2009 g Sbst.: 0,3480 g CO_2, 0,1250 g H_2O. — 0,2837 g Sbst.: 28,45 ccm $^1/_{10}$-Normal-Ammoniak.

$C_8H_{14}O_4N_2$. Ber. C 47,52, H 6,93, N 13,86.
Gef. „ 47,24, „ 6,91, „ 14,04.

Schmp. 152° (korr.). In Wasser recht leicht, und dann successive schwerer löslich in Alkohol, Chloroform und Äther.

Carbonyl-di-glycylglycinester,
$CO(NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5)_2$.

Zu einer stark gekühlten Lösung von 10 g salzsaurem Glycylglycinester in 20 ccm Wasser fügte man 2 ccm einer 6-fach normalen Natronlauge, dann 1 ccm einer Lösung von Phosgen in Toluol, welche in 100 ccm 15 g $COCl_2$ enthielt. Beim kräftigen Umschütteln verschwand der Geruch des Phosgens sehr rasch. Jetzt wurde unter dauernder Kühlung und Schütteln immer je 1 ccm der Natronlauge und der Phosgenlösung zugefügt, bis 20 ccm der letzteren verbraucht waren. Die Menge des Alkalis war so gewählt, daß sie ausreichte, um alles Chlor zu binden. Während der Operation fiel der schwer lösliche Carbonylkörper kristallinisch aus. Er wurde abfiltriert, aus heißem Wasser umkristallisiert und zur Analyse bei 100° getrocknet.

0,1804 g Sbst.: 0,2981 g CO_2, 0,1038 g H_2O. — 0,2196 g Sbst.: 30,4 ccm N (19°, 773 mm).

$C_{13}H_{22}O_7N_4$. Ber. C 45,09, H 6,36, N 16,18.
Gef. „ 45,07, „ 6,39, „ 16,17.

Die Ausbeute an analysenreinem Material betrug 5 g oder 57% der Theorie. Die Verbindung schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 233° (korr.) unter Gasentwickelung. Sie löst sich in ungefähr 90 Teilen kochendem Wasser und fällt beim Erkalten in sehr feinen, farblosen Stäbchen aus. In Alkohol und Aceton ist sie schwerer löslich als in Wasser, und in Äther oder Benzol fast unlöslich. Dagegen wird sie von heißem Eisessig ziemlich leicht aufgenommen und kristallisiert daraus beim Erkalten ebenfalls in Nädelchen. In verdünntem kalten Alkali ist sie nicht löslich.

Carbonyl-di-glycylglycin,
$CO(NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH)_2$.

Zur Verseifung wurden 2 g Carbonyldiglycylglycinester mit 100 ccm Wasser und 12 ccm Normalnatronlauge (statt der auf 2 Mol. berechneten 11,6 ccm) am Rückflußkühler gekocht. Nach 10 Minuten war Lösung eingetreten, und nach $2^1/_2$ Stunden war die alkalische Reaktion der Flüssigkeit verschwunden. Sie wurde mit 12 ccm Normal-Salzsäure versetzt und auf dem Wasserbade bis zu etwa 15 ccm eingedampft. Beim Abkühlen schied sich das Carbonyldiglycylglycin ab; es wurde aus 8 ccm siedendem Wasser umkristallisiert und für die Analyse im

Vakuum getrocknet. Die Ausbeute an analysenreiner Substanz betrug 0,8 g oder 47% der Theorie.

0,1528 g Sbst.: 0,2078 g CO_2, 0,0684 g H_2O. — 0,2380 g Sbst.: 33,04 ccm $^1/_{10}$-Normal-Ammoniak.

$C_9H_{14}O_7N_4$. Ber. C 37,24, H 4,83, N 19,31.
Gef. „ 37,09, „ 4,97, „ 19,43.

Die Säure schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 232° (korr.) unter Aufschäumen und Dunkelfärbung. Sie löst sich in etwa 10 Teilen heißem Wasser, schwerer in Alkohol, Aceton und Eisessig und noch schwerer in Chloroform, Benzol oder Äther. Sie reagiert und schmeckt sauer. Die Lösung des Ammoniumsalzes gibt mit Silbernitrat einen weißen, in der Kälte sehr schwer löslichen Niederschlag, der aus heißem Wasser in sehr kleinen Prismen kristallisiert. Mit Kupfersulfat oder Baryumchlorid gibt das Ammoniumsalz keine Niederschläge. Die alkalische Lösung der Säure löst Kupferhydroxyd mit stark blauer Farbe, und diese Lösung scheidet beim Kochen, wenn genügend Alkali zugegen ist, langsam Kupferoxydul ab.

Carbonyl-di-glycylglycinamid,
$CO(NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2)_2$.

Schließt man den fein gepulverten Carbonyldiglycylglycinester mit einem Überschuß von flüssigem Ammoniak in ein Rohr ein, so erfolgt die Amidbildnug bei gewöhnlicher Temperatur, bleibt aber unvollständig, weil die Substanz sich nicht löst. Es ist deshalb nötig, nach mehrtägiger Einwirkung des Ammoniaks das Rohr zu öffnen, die Masse sorgfältig zu zerreiben und nochmals in der gleichen Weise mit Ammoniak zu behandeln. Schließlich wird das Produkt nach dem Verdunsten des Ammoniaks aus der 50-fachen Menge heißem Wasser, dem etwas Ammoniak zugesetzt ist, umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt dann 77% der Theorie. Für die Analyse wurde im Vakuum getrocknet:

0,1802 g Sbst.: 0,2468 g CO_2, 0,0939 g H_2O. — 0,2138 g Sbst.: 44,36 ccm $^1/_{10}$-Normal-Ammoniak.

$C_9H_{16}O_5N_6$. Ber. C 37,50, H 5,55, N 29,17.
Gef. „ 37,35, „ 5,80, „ 29,05.

Das Amid schmilzt im Kapillarrohr gegen 270° (korr.) unter Gasentwickelung und Schwärzung. Es kristallisiert aus heißem Wasser in sehr kleinen, meist zu Büscheln vereinigten Nädelchen, die beim Abfiltrieren eine silberglänzende Masse bilden.

Die wässerige Lösung gibt mit Alkali und wenig Kupfersalz die Biuretfärbung. Dagegen erzeugt Phosphorwolframsäure weder in der wässerigen, noch in der schwefelsauren Lösung einen Niederschlag.

Carboxäthyl-alanyl-alaninester,
$C_2H_5CO_2.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).CO_2C_2H_5$.

Übergießt man 2 g gepulvertes Alaninanhydrid mit 20 ccm Alkohol und sättigt unter mäßiger Kühlung mit Salzsäuregas, so erfolgt Lösung. Dieselbe wird zur Vervollständigung der Spaltung $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbade erwärmt und dann rasch in einer Platinschale verdampft. Dabei bleibt ein Sirup zurück, der zweifellos das Hydrochlorat des Alanylalaninesters enthält, aber bisher nicht kristallisierte. Ebenso erfolglos war der Versuch, die entsprechende Methylverbindung fest zu erhalten. In letzterem Falle wurde auch der freie Ester mit Kaliumcarbonat hergestellt und mit Chloroform extrahiert. Er war ebenfalls ein Sirup, der sich leicht in Alaninanhydrid zurückverwandelte.

Schönere Eigenschaften besitzt, wie schon erwähnt, die Carboxäthylverbindung. Für ihre Bereitung wurde der oben erwähnte Sirup, welcher den salzsauren Alanylalaninäthylester enthielt, 12 Stunden im Vakuum über Ätzkalk zur Entfernung der Salzsäure aufbewahrt, dann in 5 ccm Wasser gelöst, gut gekühlt, 1,4 ccm Natronlauge (33-proz.), ferner 2 g Natriumcarbonat (trocken), welches in möglichst wenig Wasser gelöst war, endlich 2 g Chlorkohlensäureester zugefügt und tüchtig geschüttelt, bis nach einigen Minuten der Geruch des letzteren verschwunden war. Jetzt wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und die filtrierte Chloroformlösung verdampft.

Der zurückbleibende Sirup erstarrte über Nacht zum großen Teil kristallinisch. Die Masse wurde abgepreßt, dann in Äther gelöst und durch Zusatz von Ligroïn wieder abgeschieden. Die so erhaltenen farblosen Nadeln schmolzen bei 70° (korr.) und wurden für die Analyse im Vakuum getrocknet.

0,1823 g Sbst.: 0,3373 g CO_2, 0,1253 g H_2O. — 0,2420 g Sbst.: 18,95 ccm $^1/_{10}$-Normal-Ammoniak.

$C_{11}H_{20}O_5N_2$.	Ber.	C 50,77,	H 7,69,	N 10,77.
	Gef.	„ 50,46,	„ 7,64,	„ 10,97.

Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 1,2 g aus 2 g Alaninanhydrid.

Der Ester wird von den üblichen Lösungsmitteln, mit Ausnahme des Ligroïns, leicht aufgenommen. Bei Gegenwart von überschüssigem Alkali löst er Kupferhydroxyd mit tief blauer Farbe.

Leucylleucin,
$NH_2.CH(C_4H_9).CO.NH.CH(C_4H_9).COOH$.

Das in Wasser äußerst schwer lösliche Leucinimid löst sich in Mineralsäuren um so leichter, je konzentrierter sie sind. Die Sprengung des Piperazinrings erfolgt jedoch erst bei höherer Temperatur und führt

bei längerer Dauer des Erhitzens bis zum Leucin. Um das Zwischenprodukt in erheblicher Menge zu gewinnen, empfiehlt es sich deshalb, die Operation zu unterbrechen, bevor alles Leucinimid zerlegt ist. Dem entspricht folgende Vorschrift:

3 g reines Leucinimid werden mit 10 ccm Bromwasserstoff, welcher bei 0° gesättigt ist, im geschlossenen Rohr $^1/_2$ Stunde auf 100° erhitzt, dann die schwach braune Flüssigkeit unter 10 mm Druck verdampft, nach Zusatz von Wasser wieder in der gleichen Weise verdampft und der Rückstand mit kaltem Wasser aufgenommen, wobei das unveränderte Leucinimid, etwa ein Drittel der angewandten Menge, zurückbleibt. Man verdünnt das Filtrat auf etwa 250 ccm, schüttelt zur Entfernung des Bromwasserstoffs mit Silbercarbonat und befreit die Mutterlauge mit Schwefelwasserstoff vom Silber. Wird die filtrierte Lösung dann unter vermindertem Druck stark eingedampft, so fällt das Leucylleucin als farblose, kristallinische Masse aus. Es wurde in 45 ccm kochendem Wasser gelöst und durch Abkühlung auf 0° in kleinen, farblosen Nadeln wieder abgeschieden. Die Ausbeute an diesem reinen Präparat betrug 1 g. Aus der Mutterlauge wurden noch 0,4 g eines weniger reinen Produktes gewonnen.

Für die Analyse wurde das erste Präparat nochmals aus warmem Wasser umkristallisiert. Die glänzenden Kristalle enthalten Wasser, verlieren dasselbe aber schon im Vakuumexsikkator und zerfallen dabei zu einem lockeren Pulver. Die Menge des Wassers beträgt für die lufttrocknen Kristalle $1^1/_2$ Moleküle.

0,3513 g Sbst. bei 109°: 0,0341 g H_2O.

$C_{12}H_{24}O_3N_2 + 1^1/_2\,H_2O$. Ber. H_2O 9,96. Gef. H_2O 9,71.

Die trockne Substanz gab folgende Zahlen:

0,1920 g Sbst.: 0,4143 g CO_2, 0,1720 g H_2O. — 0,1829 g Sbst.: 17,8 ccm N (18°, 766 mm).

$C_{12}H_{24}O_3N_2$. Ber. C 59,02, H 9,84, N 11,47.
Gef. „ 58,85, „ 9,95, „ 11,33.

Das Leucylleucin hat keinen scharfen Schmelzpunkt. Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr sintert es bei 260° und schmilzt etwas über 270°. Unter Abspaltung von Wasser wird dabei Leucinimid zurückgebildet.

Es löst sich in ungefähr 30 Teilen kochendem Wasser, ziemlich leicht auch in wasserfreiem Methylalkohol. Von Äthylalkohol und Aceton wird es nur sehr wenig gelöst, von Äther gar nicht.

Es schmeckt schwach bitter.

Das Kupfersalz ist, wie bei den anderen Aminosäuren, tiefblau gefärbt und unterscheidet sich von dem Leucinkupfer durch die viel

größere Löslichkeit in Wasser und die geringe Neigung zum Kristallisieren.

Biuretreaktion.

Von den neuen Verbindungen, welche in dieser und der früheren Mitteilung beschrieben wurden, zeigen nur drei in alkalischer Lösung mit Fehlingscher Flüssigkeit oder auf Zusatz von gewöhnlichen Kupfersalzen die Rotviolettfärbung des Biurets.

Das sind Carboxäthylglycylglycinamid, $C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$, Carboxäthylglycylglycylleucinester, $C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH(C_4H_9).CO_2C_2H_5$, und Carbonyldiglycylglycinamid, $CO(NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2)_2$.

Alle drei können, wie leicht ersichtlich, mit dem Glycinamid, $NH_2.CH_2.CO.NH_2$, verglichen werden, von dem schon H. Schiff[1]) gezeigt hat, daß es die Biuretfärbung gibt. Bemerkenswert ist aber, daß die dem ersten, oben erwähnten Amid entsprechende freie Säure $COOH.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$, obgleich sie den Rest des Glycinamids in derselben Form enthält, die Biuretfärbung nicht mehr gibt; es scheint demnach, daß saure Gruppen im Molekül die Biuretreaktion aufheben können.

Einer Verallgemeinerung dieses Schlusses steht aber das Verhalten des α-Asparagins, $COOH.CH_2.CH(NH_2).CO.NH_2$, entgegen, welches nach der Beobachtung von H. Schiff[1]) die rote Biuretfärbung zeigt. Im Gegensatz dazu gibt das gewöhnliche Asparagin, $COOH.CH(NH_2).CH_2.CO.NH_2$, mit Alkali und wenig Kupfersalz eine blauviolette Farbe, welche durch mehr Kupfer in blau übergeht. Schiff nannte das „blauviolette Biuretreaktion", nach meinem Gefühl ist aber der Stich ins Violette hier so gering, daß man kaum noch von einer Ähnlichkeit mit dem Biuret reden kann. Recht stark wird dagegen die violettrote Farbe wieder bei dem Diamid der Asparaginsäure, $NH_2.CO.CH(NH_2).CH_2.CO.NH_2$, welches Herr Ernst Koenigs auf meine Veranlassung aus dem Asparaginsäureester mit Ammoniak dargestellt hat, und welches bei 131° schmilzt.

Diese Beobachtung steht mit der Ansicht von Schiff über die Ursache der Biuretreaktion in guter Übereinstimmung.

Bei der Ausführung obiger Versuche habe ich mich der wertvollen Hilfe des Herrn Dr. Otto Wolfes erfreut, wofür ich demselben besten Dank sage.

---

[1]) Ann. d. Chem. **310**, 37 [1900].

22. Emil Fischer: Synthese von Derivaten der Polypeptide[1]).

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **36**, 2094 (1903).
(Eingegangen am 18. Juni.)

In den Proteïnstoffen sind die Aminosäuren höchstwahrscheinlich nach Art der Säureamide miteinander verkuppelt. Dafür spricht, wie ich früher wiederholt betont habe, nicht allein die Hydrolyse durch Säuren und Alkalien, sondern insbesondere auch die Beobachtung, daß aus dem Seidenfibroïn durch partielle Spaltung ein Stoff entsteht, der wahrscheinlich eine solche Kombination von Glykocoll mit Alanin ist[2]). Ich habe mich deshalb schon seit längerer Zeit bemüht, solche einfache Anhydride der Aminosäuren synthetisch zu bereiten. Der erste Erfolg in dieser Richtung war die Gewinnung des Glycylglycins, $NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$, welches aus dem Glycinanhydrid (Diacipiperazin) durch Aufspaltung mit Säuren gewonnen wird[3]). Um an dieses System ein drittes Molekül einer Aminosäure anzuheften, mußte ein Kunstgriff angewendet werden. Die leicht veränderliche Aminogruppe wurde festgelegt durch Einführung der Carbäthoxylgruppe, und die so resultierende Verbindung, Carbäthoxylglycylglycin, konnte dann in Form ihres Esters mit anderen Aminosäureestern durch bloßes Erhitzen kombiniert werden. Es gelang auf diesem Wege, folgendes System $C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH.(C_4H_9).CO_2C_2H_5$ (Carbäthoxyldiglycylleucinester) zu gewinnen[4]).

Die weitere Fortsetzung der Synthese stieß aber auf Schwierigkeiten, weil diese komplizierten Ester immer weniger zu Kondensationen geneigt werden. Ich habe deshalb nach einer anderen Methode gesucht, die den Erfolg unter leichteren Bedingungen gewährleistet und dieselbe in folgenden Reaktionen gefunden.

---

[1]) Der Berliner Akademie vorgelegt am 2. April 1903. Siehe Sitzungsberichte **1903**, 387; ferner Chem. Zentralblatt **1903**, I, 1303.

[2]) Chemikerzeitung **1902**, Nr. 80. Bericht über die Naturforscherversammlung zu Karlsbad. Autoreferat. (*S. 621.*)

[3]) E. Fischer und E. Fourneau, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2870 [1901]. (*S. 279.*)

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1100 [1902]. (*S. 295.*)

Während die gewöhnlichen Aminosäuren bisher auf keine Weise in die entsprechenden Säurechloride verwandelt werden können, gelingt dies nach Einführung der Carbäthoxylgruppe mit Hilfe von Thionylchlorid, das von Hans Meyer mit so gutem Erfolg zur Bereitung der Chloride der Pyridincarbonsäure benutzt wurde. So wird das Carbäthoxylglycin, $C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO_2H$, durch ganz gelindes Erwärmen mit Thionylchlorid recht glatt in das Chlorid umgewandelt, und dieses reagiert dann mit den Estern der Aminosäuren schon bei niederer Temperatur. Nach Versuchen, die in der zweiten Abhandlung beschrieben sind, kann man auf diese Art den Carbäthoxylglycylglycinester oder den Carbäthoxyldiglycylglycinester, $(C_2H_5O_2C).NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$, leicht bereiten. Dasselbe Verfahren läßt sich nun glücklicherweise von neuem auf diese komplizierten Systeme anwenden. Wird z. B. Carbäthoxylglycylglycin mit Thionylchlorid behandelt, so entsteht ein Chlorid, welches zwar nicht analysiert wurde, aber aller Wahrscheinlichkeit nach folgende Struktur hat: $C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.Cl$. Dieses Chlorid kann dann mit Glycylglycinester kombiniert werden, und es entsteht folgende Verbindung: $C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$, in welcher nicht weniger als vier Glycinmoleküle anhydridartig verkuppelt sind, und die ich Carbäthoxyltriglycylglycinester nenne[1]). Die Estergruppen sind darin recht reaktionsfähig. Durch Verseifung erhält man Säuren, und durch Ammoniak läßt sich auch eine derselben leicht in die Amidgruppe verwandeln. Dieser letzten Verbindung gebe ich die Formel:

$$C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2.$$

Es liegt auf der Hand, daß man mit Hilfe des gleichen Verfahrens zahllose Kombinationen durch Verwendung der verschiedenen Aminosäuren bereiten kann, und wenn man noch die Diamino- und Oxyamino-Säuren heranzieht, so werden meiner Ansicht nach Produkte zum Vorschein kommen, die mit den natürlichen Peptonen schon manche Ähnlichkeit besitzen. Ein fremdes Element darin ist nur noch das Carbäthoxyl, bzw. in den freien Säuren das Carboxyl, welches an den Stickstoff gebunden ist. Ich hatte erwartet, daß diese Gruppe sich leicht als Kohlensäure abspalten lasse, wie dies bei der Carbaminsäure und der Allophansäure so leicht gelingt. Das ist aber nicht der Fall,

---

[1]) Ähnliche Verbindungen der Benzoësäure hat kürzlich Herr Th. Curtius aus Hippurylglycin nach einem anderen Verfahren dargestellt, aber leider bei ihrer Beschreibung meine älteren Versuche, deren Ziel doch deutlich genug von mir angegeben ist, nicht erwähnt. (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3226 [1902].)

da die Kohlensäure hier auffallend fest haftet, und es bedarf noch der Auffindung eines besonderen Verfahrens, um sie ohne tiefergehende Veränderung des Moleküls zu entfernen. Solche Erfahrungen zeigen, wie wenig man aus dem bisherigen Beobachtungsmaterial auf die Eigenschaften jener komplizierten Stoffe, für welche ich den Sammelnamen Polypeptide[1]) vorgeschlagen habe, schließen kann. Man muß vielmehr darauf gefaßt sein, hier ganz eigenartigen Erscheinungen zu begegnen, und ich kann schon jetzt eine neue unerwartete Isomerie erwähnen. Der eben angeführte Carbäthoxylglycylglycinester wird durch überschüssiges Alkali zu einer Dicarbonsäure verseift, die ich unter dem Namen Glycylglycincarbonsäure beschrieben habe[2]), und der nach der Bildungsweise folgende Struktur zugeschrieben wurde: $HO_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$. Durch Erhitzen mit alkoholischer Salzsäure läßt sich nun diese Verbindung leicht in einen neutralen Ester zurückverwandeln. Derselbe hat zwar die gleiche Zusammensetzung wie der ursprüngliche Ester, ist aber von ihm sowohl in den physikalischen Eigenschaften wie in manchen chemischen Reaktionen total verschieden. Während z. B. der ältere Ester bei der Behandlung mit flüssigem Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur in ein Monamid verwandelt wird, geht der zweite in ein Diamid über. Die beiden Ester bieten mithin ein neues Beispiel von Isomerie dar, die aber bei der Rückverwandlung in die Dicarbonsäure wieder verschwindet. Ob die Ursache dieser Erscheinungen, die an die Isomerie der Monomethylharnsäuren erinnern[3]), in der Struktur der Carbäthoxylimidgruppe oder der anderen Säureamidgruppen liegt, läßt sich nach den bisherigen Beobachtungen nicht sicher beurteilen. Ich unterscheide deshalb vorläufig die beiden Ester als α- und β-Verbindung.

Die gleiche Art der Isomerie wurde bei dem Carbäthoxyldiglycylglycinester gefunden. Sie besteht endlich auch bei den Doppelamiden, wie folgende Beobachtung zeigt. Aus dem Glycylglycinester entsteht durch Anlagerung von Cyansäure ein Harnstoff, dem ich nach der Bildungsweise die Formel $NH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$ und den Namen Carbamidoglycylglycinester gegeben habe[4]). Letzterer verwandelt sich bei der Behandlung mit flüssigem Ammoniak in das entsprechende Amid, und dieses ist wiederum nicht, wie man hätte erwarten sollen, identisch, sondern isomer mit dem Doppelamid, das aus dem β-Carbäthoxylglycylglycinester entsteht.

---

[1]) Vortrag zu Karlsbad, Chemikerzeitung **1902**.
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1097 [1902]. (*S. 293.*)
[3]) E. Fischer u. F. Ach, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2721 [1899].
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1099 [1902]. (*S. 294.*)

Die eben erwähnte Methode zur Verkupplung von Aminosäuren läßt sich auch auf andere Säurederivate der Aminosäuren übertragen. Ich habe sie speziell benutzt, um einige β-Naphtalinsulfoderivate der Dipeptide zu bereiten, weil diese Produkte für die Abscheidung der betreffenden Stoffe aus komplizierten Gemischen wertvoll sind. So wurde das Chlorid des β-Naphtalinsulfoglycins kombiniert mit dem Glycin und dem Alanin.

β-Carbäthoxylglycylglycinester.

Wie zuvor erwähnt, entsteht die Verbindung bei der Veresterung der Glycylglycincarbonsäure. 3 g der letzteren werden fein gepulvert und mit 15 ccm einer bei gewöhnlicher Temperatur gesättigten Lösung von Salzsäure in absolutem Alkohol einige Minuten gekocht, bis völlige Lösung eingetreten ist. Versetzt man dann die abgekühlte Flüssigkeit mit dem 3-fachen Volumen Äther, so beginnt nach kurzer Zeit die Kristallisation des neuen Esters. Derselbe wird nach einer Stunde abfiltriert und mit Äther gewaschen. Die Ausbeute betrug 3,4 g, was ungefähr 86% der Theorie entspricht. Zur Reinigung wird das Produkt aus ungefähr der 6-fachen Menge heißem, absolutem Alkohol umkristallisiert. Es bildet dann kleine, farblose Prismen, welche für die Analyse über Schwefelsäure getrocknet waren.

0,1949 g Sbst. :0,3312 g CO_2, 0,1168 g H_2O. — 0,1995 g Sbst.: 21,1 ccm N (21°, 772 mm).

$C_9H_{16}O_5N_2$. Ber. C 46,55, H 6,89, N 12,07.
Gef. „ 46,35, „ 6,72, „ 12,24.

Der Ester schmilzt nicht ganz scharf bei 146—148° (korr. 148 bis 150°), nachdem er einige Grade vorher gesintert ist, während die isomere α-Verbindung bei 87° (korr.) schmilzt. Der neue Ester ist in Äther so gut wie unlöslich, auch von Benzol wird er recht schwer gelöst und kristallisiert daraus in äußerst feinen Nädelchen. Von Chloroform wird er leichter aufgenommen; aus heißem Wasser, wovon er fast ebenso leicht wie von Alkohol gelöst wird, läßt er sich gleichfalls gut umkristallisieren.

Behufs Rückverwandlung in die Dicarbonsäure wurde 1 g mit 10 g Normal-Natronlauge 4 Stunden am Rückflußkühler gekocht und dann nach Zugabe von 10 ccm Normal-Salzsäure auf die Hälfte eingedampft. Beim Abkühlen schied sich die Dicarbonsäure aus, und ihre Menge betrug nach längerem Stehen 0,64 g oder 84% der Theorie. In Schmelzpunkt, äußerer Form der Kristalle und der Löslichkeit zeigte sie keine bemerkbare Verschiedenheit von der ursprünglichen Glycylglycincarbonsäure.

0,1087 g Sbst.: 15,4 ccm N (20°, 757 mm).

$C_5H_8O_5N_2$. Ber. N 15,91. Gef. N 16,15.

Einwirkung von flüssigem Ammoniak auf den β-Carbäthoxylglycylglycinester.

Wird der gepulverte Ester im Einschmelzrohr mit ungefähr der 4-fachen Menge flüssigem Ammoniak zusammengebracht, so entsteht, sobald die Flüssigkeit sich auf Zimmertemperatur erwärmt hat, klare Lösung. Öffnet man nach 36-stündigem Liegen bei gewöhnlicher Temperatur das vorher stark abgekühlte Rohr und läßt das Ammoniak verdunsten, so bleibt eine farblose, feste Masse, die in absolutem Alkohol so gut wie unlöslich ist. Sie wurde aus ungefähr der 7-fachen Menge heißem Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug die Hälfte des angewandten Esters oder $^2/_3$ der Theorie. Für die Analyse war das Präparat noch einmal aus Wasser umgelöst und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1596 g Sbst.: 0,2023 g CO_2, 0,0841 g H_2O. — 0,0669 g Sbst.: 18,6 ccm N (19°, 768 mm).

$C_5H_{10}O_3N_4$. Ber. C 34,47, H 5,80, N 32,17.
Gef. „ 34,57, „ 5,91, „ 32,31.

Die Verbindung hat keinen scharfen Schmelzpunkt. Sie bräunt sich beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 230° und schmilzt gegen 240° (korr. 246°) unter Zersetzung. Ihre wässerige Lösung reagiert neutral und schmeckt schwach süß. Versetzt man sie mit Alkali und Kupfervitriol, so erhält man nicht die rote Farbe des Biuret, sondern eine rein blaue Färbung. Das Amid löst sich sehr leicht in starker Salz- oder Salpetersäure. Mit Platinchlorid gibt es in konzentrierter, kalter Lösung feine gelbe, häufig sechsseitige Täfelchen, die sich in der Wärme wieder leicht lösen. Phosphorwolframsäure fällt die verdünnte wässerige Lösung nicht. Ich nenne die Verbindung vorläufig β-Carbamidoglycylglycinamid.

α-Carbamidoglycylglycinamid,
$NH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$.

Um dieses mit der vorhergehenden Verbindung isomere Amid zu bereiten, bewahrt man den früher beschriebenen Carbamidoglycylglycinester mit etwa der vierfachen Menge flüssigem Ammoniak im Einschmelzrohr 36 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur auf. Anfangs erfolgt klare Lösung; ob später Ausscheidung des neuen Amids stattfindet, hängt von der Menge des Ammoniaks ab. Wird das abgekühlte Rohr geöffnet und das Ammoniak verdunstet, so bleibt ein farbloser Rückstand, welcher aus der drei- bis vierfachen Menge heißem Wasser umkristallisiert wird. Die Ausbeute an kristallisiertem Präparat betrug $^2/_3$ des angewandten Esters oder 77% der Theorie.

Für die Analyse wurde nochmals aus Wasser umgelöst und im Vakuum getrocknet.

0,1902 g Sbst.: 0,2402 g CO_2, 0,0984 g H_2O. — 0,0948 g Sbst.: 26,9 ccm N (21°, 756 mm).

$C_5H_{10}O_3N_4$. Ber. C 34,47, H 5,80, N 32,17.
Gef. „ 34,44, „ 5,80, „ 32,12.

Die Substanz kristallisiert aus Wasser in kleinen, schief abgeschnittenen Prismen, welche auch bisweilen wie schmale Tafeln aussehen. Im Kapillarrohr rasch erhitzt, schmilzt sie gegen 206° (korr. 210°) unter Gasentwickelung, mithin erheblich niedriger als die isomere Substanz. Sie ist auch in Wasser, Alkohol und Chloroform leichter löslich als jene. Als weiterer Unterschied ist die blauviolette Färbung zu erwähnen, die sie mit Alkali und Kupfersalzen gibt.

Einwirkung von Thionylchlorid auf Carbäthoxylglycylglycin.

Übergießt man 3 g der fein gepulverten Glycinverbindung mit 2 g Thionylchlorid und erwärmt vorsichtig auf 35—40°, so gibt sich der Eintritt der Reaktion durch Gasentwickelung kund. Die Masse färbt sich rötlich, und nach etwa 5 Minuten ist der Prozeß beendet. Verdunstet man jetzt den kleinen Überschuß des Thionylchlorids bei 40° unter stark vermindertem Druck, so bleibt eine amorphe, rotgefärbte Masse zurück, die aller Wahrscheinlichkeit nach das Chlorid des Carbäthoxylglycylglycins,

$$C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COCl,$$

enthält. Leider ist seine Kristallisation bisher nicht gelungen, und es mußte deshalb das Rohprodukt direkt für die Synthese verwendet werden.

Carbäthoxyldiglycylglycinester,

$$C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2.C_2H_5.$$

Um die Verbindung aus dem zuvor erwähnten Chlorid zu bereiten, löst man dasselbe in Chloroform. Verwendet man 20 ccm auf die Menge, welche aus 3 g Carbäthoxylglycylglycin entsteht, so bleibt nur ein geringer Rückstand. Diese Flüssigkeit wird ohne vorherige Filtration eingegossen in die gekühlte Lösung von 4 g Glycinester in 20 g Chloroform. Die Wechselwirkung tritt sofort ein. Das Chloroform wird jetzt verdampft, der Rückstand mit 20 ccm Wasser aufgenommen und die von einem geringen Rest abfiltrierte Flüssigkeit im Exsikkator bis auf 6 ccm verdunstet. Dabei fällt die neue Verbindung als kristallinische Masse aus. Die Ausbeute an diesem Produkt schwankte bei verschiedenen

Versuchen zwischen 25 und 40% der Theorie. In der wässerigen Mutterlauge bleibt der gleichzeitig gebildete salzsaure Glycinester bzw. Glycinhydrochlorat. Das Rohprodukt wird aus warmem Sprit oder 3—4 Teilen heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert. Für die Analyse war das Präparat im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1803 g Sbst.: 0,3028 g CO_2, 0,1065 g H_2O. — 0,1308 g Sbst.: 16,3 ccm N (20°, 769 mm).

$C_{11}H_{19}O_6N_3$. Ber. C 45,64, H 6,64, N 14,52.
Gef. „ 45,80, „ 6,62, „ 14,43.

Der Carbäthoxyldiglycylglycinester schmilzt bei 160—161° (korr. 163—164°) und kristallisiert meist in mikroskopisch kleinen Nadeln, die häufig kugelförmig zusammengewachsen sind. Die Löslichkeit nimmt successive für Alkohol, Chloroform, Äther ab. Mit Alkali und Kupfersalz gibt er eine ziemlich stark ins Rötliche spielende blauviolette Farbe.

Dieselbe Verbindung entsteht aus dem Chlorid des Carbäthoxylglycins durch Kombination mit Glycylglycinester, und dieses Verfahren, welches in nachfolgender Abhandlung ausführlich beschrieben wird, ist für die praktische Darstellung der viel besseren Ausbeute wegen vorzuziehen. Nach ihm wurde auch das Material gewonnen, welches für die Bereitung der nachfolgenden Derivate diente.

Bei der Verseifung mit Alkali liefert der Doppelester zunächst eine Monocarbonsäure, und bei weiterer Einwirkung die Doppelsäure; nach der Analogie mit dem Carbäthoxylglycylglycinester nehme ich an, daß die Verseifung zuerst an der Gruppe des Glycinesters eintritt.

Carbäthoxyldiglycylglycin,

$C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$.

Werden 5 g des gepulverten Carbäthoxyldiglycylglycinesters mit 20 ccm Normal-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt, so tritt nach einigen Minuten klare Lösung ein. Nach zweistündigem Stehen versetzt man mit 21 ccm Normal-Salzsäure. Die Abscheidung der neuen Säure erfolgt dann spontan, und ihre Menge betrug nach 15 Stunden 3,3 g. Aus der eingedampften Mutterlauge wurden noch 0,35 g gewonnen, so daß die Gesamtausbeute 81% der Theorie erreichte. Das Rohprodukt wurde aus 20 ccm heißem Wasser umgelöst, wobei nur ein geringer Verlust eintrat. Für die Analyse war im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1900 g Sbst.: 0,2900 g CO_2, 0,0985 g H_2O. — 0,1174 g Sbst.: 15,8 ccm N (18°, 764 mm).

$C_9H_{15}O_6N_3$. Ber. C 41,35, H 5,82, N 16,08.
Gef. „ 41,63, „ 5,81, „ 15,63.

Die Säure löst sich in weniger als der dreifachen Menge heißem Wasser und kristallisiert daraus in mikroskopischen Nadeln oder dünnen Prismen. Im Kapillarrohr rasch erhitzt sintert sie gegen 200° und schmilzt von 208—210° (korr. 212—214°) unter schwacher Färbung. In heißem Alkohol und Chloroform ist sie recht schwer löslich; die wässerige Lösung reagiert stark sauer, löst Kupferoxyd beim Kochen mit schwach blauer Farbe und gibt mit Alkali und Kupfersalz eine kräftige, ins Violette spielende blaue Färbung. Versetzt man die nicht zu verdünnte Lösung der Säure in Ammoniak mit Silbernitrat, so entsteht ein farbloser Niederschlag, der aus feinen, meist konzentrisch verwachsenen Nädelchen besteht und sich in heißem Wasser leicht löst.

Diglycylglycincarbonsäure,
$CO_2H.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$.

3 g des Carbäthoxyldiglycylglycinesters werden in 24 ccm Normal-Natronlauge (etwas mehr als 2 Molekülen) gelöst und 5 Stunden auf 80° erwärmt, dann mit 24 ccm Normal-Salzsäure versetzt und die Flüssigkeit auf dem Wasserbade auf etwa 10 ccm eingedampft. Beim Abkühlen scheidet sich die neue Säure in Form eines sandigen, kristallinischen Pulvers ab. Die Ausbeute betrug 1 g, und die Mutterlauge gab nach dem Einengen noch 0,15 g, was ungefähr 48% der Theorie entspricht. Das Rohprodukt wurde zur Analyse zweimal aus je 5 ccm Wasser umgelöst und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2001 g Sbst.: 0,2651 g CO_2, 0,0845 g H_2O. — 0,1718 g Sbst.: 26,6 ccm N (21°, 772 mm).

$C_7H_{11}O_6N_3$.	Ber. C 36,04, H 4,76, N 18,02.
	Gef. „ 36,13, „ 4,73, „ 17,91.

Die Säure kristallisiert aus warmem Wasser in mikroskopisch kleinen, schiefen Tafeln und schmilzt, im Kapillarrohr rasch erhitzt, gegen 206° (korr. 210°) unter Zersetzung. Ihre wässerige Lösung reagiert stark sauer und löst Kupferoxyd beim Kochen mit blaßgrünblauer Farbe. Beim Eindampfen dieser Lösung scheidet sich das Kupfersalz kristallinisch ab. In heißem Alkohol ist die Säure sehr schwer löslich.

Carbäthoxyldiglycylglycinamid,
$C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$.

Werden 3 g Carbäthoxyldiglycylglycinester im Einschmelzrohr mit etwa der doppelten Menge flüssigem Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt, so erfolgt sehr bald Lösung, und nach 2 Tagen ist eine reichliche Kristallisation eingetreten. Man läßt nun das Ammoniak

verdunsten und kristallisiert den farblosen Rückstand aus etwa 60 ccm heißem 60-prozentigen Alkohol. Die Ausbeute des so gereinigten Produktes betrug 2,3 g oder 85% der Theorie. Zur Analyse war das Präparat nochmals in warmem Wasser gelöst, durch Zusatz von Alkohol wieder abgeschieden und über Schwefelsäure getrocknet.

0,2010 g Sbst.: 0,3067 g CO_2, 0,1116 g H_2O. — 0,1837 g Sbst.: 33,7 ccm N (17°, 769 mm).

$C_9H_{16}O_5N_4$. Ber. C 41,51, H 6,23, N 21,52.
Gef. „ 41,61, „ 6,22, „ 21,56.

Die Verbindung schmilzt im Kapillarrohr beim raschen Erhitzen gegen 230° (korr. 235°) unter schwacher Färbung, nachdem sie schon vorher etwas gesintert ist. Sie löst sich in etwa 6 Teilen kochendem Wasser und kristallisiert daraus in mikroskopisch kleinen Prismen oder Platten. In absolutem Alkohol ist sie schwer löslich. Mit Alkali und Kupfersalzen gibt sie eine schön rotviolette Färbung, ähnlich dem Biuret.

Durch vorsichtige Verseifung wird sie in die folgende Säure verwandelt:

Diglycylglycinamidcarbonsäure,
$HO_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$.

3 g Carbäthoxyldiglycylglycinamid werden in 120 ccm heißem Wasser gelöst, dann rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt, wobei Kristallisation erfolgt, und nach Zusatz von 13 ccm Normal-Natronlauge geschüttelt, bis wieder klare Lösung erfolgt ist. Man läßt jetzt noch eine Stunde bei gewöhnlicher Temperatur stehen und fügt dann 13 ccm Normal-Salzsäure zu. Nach kurzer Zeit beginnt die Kristallisation der neuen Säure. Sie wird nach einer Stunde abfiltriert. Die Mutterlauge gibt beim Eindampfen nur noch eine geringe Kristallisation. Die gesamte Ausbeute betrug 1,74 g oder 65% der Theorie. Zur Analyse wurde das Präparat zweimal aus je 40 ccm heißem Wasser umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1826 g Sbst.: 0,2420 g CO_2, 0,0859 g H_2O. — 0,1320 g Sbst.: 27,9 ccm N (20°, 772 mm).

$C_7H_{12}O_5N_4$. Ber. C 36,19, H 5,21, N 24,13.
Gef. „ 36,14, „ 5,27, „ 24,58.

Die Säure kristallisiert aus heißem Wasser, worin sie ziemlich leicht löslich ist, in mikroskopisch kleinen, schiefen Tafeln und schmilzt im Kapillarrohr rasch erhitzt nicht ganz konstant bei 225—229° (korr. 230—234°) unter Zersetzung. Die wässerige Lösung reagiert sauer und

gibt mit Alkali und Kupfersalz eine blauviolette Färbung. In heißem Alkohol ist sie sehr schwer löslich.

β-Carbäthoxyldiglycylglycinester.

Die Verbindung entsteht durch Veresterung der Diglycylglycincarbonsäure, und ich nehme deshalb an, daß hier ein ähnlicher Fall von Isomerie vorliegt, wie sie ausführlich für Carbäthoxylglycylglycinester zuvor besprochen wurde.

2 g Diglycylglycincarbonsäure wurden mit 20 ccm gesättigter, alkoholischer Salzsäure einige Minuten bis zur Lösung gekocht. Beim Einengen der Flüssigkeit über Schwefelsäure und Kalk schied sich eine reichliche Menge des neuen Esters als kristallinisches Pulver ab. Der Rest wurde durch Zusatz von Äther aus der alkoholischen Lösung gefällt. Die abgepreßte Masse wog nach dem Trocknen 1,75 g. Das Produkt wurde zur Reinigung aus etwa 6 Teilen heißem Wasser umkristallisiert. Zur Analyse war das Präparat nochmals aus Wasser umgelöst und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1835 g Sbst.: 0,3077 g CO_2, 0,1098 g H_2O. — 0,1337 g Sbst.: 17,3 ccm N (20⁰, 770 mm).

$C_{11}H_{19}O_6N_3$. Ber. C 45,64, H 6,64, N 14,52.
Gef. „ 45,73, „ 6,71, „ 15,01.

Der Ester unterscheidet sich von der isomeren α-Verbindung schon in der äußeren Form; denn er fällt sowohl aus Wasser, wie aus Alkohol in sehr kleinen Kristallblättchen, die keine bestimmte Form zeigen. Der Schmelzpunkt lag auch bei mehrmaligem Umkristallisieren bei 146—148⁰ (korr. 148—150⁰), mithin etwa 12⁰ niedriger, als derjenige der isomeren Verbindung. Der neue Ester ist auch in den meisten Lösungsmitteln, besonders aber in Chloroform leichter löslich. Er gibt endlich mit Alkali und Kupfersalzen eine rein blaue Farbe.

Carbäthoxyltriglycylglycinester,
$C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$.

Für die Bereitung dieser Verbindung diente ebenfalls das Chlorid des Carbäthoxylglycylglycins, dessen Darstellung oben beschrieben ist. Das aus 4 g bereitete Chlorid wurde in 30 ccm Chloroform gelöst und mit einer Lösung von 6,3 g Glycylglycinester ebenfalls in 30 ccm Chloroform vermischt, dann das Chloroform verdampft, der Rückstand in 100 ccm heißem Wasser gelöst und mit etwas Tierkohle gekocht. Beim Abkühlen des Filtrats begann bald die Kristallisation des neuen Esters, und nach einstündigem Stehen bei 0⁰ betrug die Menge 2,2 g oder 32%

der Theorie. Da die Substanz in kaltem Wasser sehr schwer löslich ist, so läßt sich aus der Mutterlauge durch Eindampfen nur recht wenig mehr gewinnen. Zur Analyse wurde sie aus etwa 40 Teilen heißem Wasser umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet.

0,0975 g Sbst.: 0,1603 g CO_2, 0,0555 g H_2O. — 0,1601 g Sbst.: 22,3 ccm N (18°, 774 mm).

$C_{13}H_{22}O_7N_4$. Ber. C 45,06, H 6,41, N 16,18.
Gef. „ 44,84, „ 6,38, „ 16,39.

Die Substanz kristallisiert aus heißem Wasser in mikroskopisch kleinen, schief abgeschnittenen Prismen und schmilzt bei 230—231° (korr. 235—236°) unter schwacher Gelbfärbung. In Alkohol ist sie noch schwerer löslich als in Wasser.

Carbäthoxyltriglycylglycinamid,

$C_2H_5O_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH_2$.

Wird 1 g des vorhergehenden Esters fein gepulvert, mit etwa der zehnfachen Menge flüssigem Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur behandelt, so geht er langsam in Lösung, und nach 24 Stunden ist eine reichliche Menge des neuen Amids als farblose, kristallinische Masse abgeschieden. Man läßt dann das Ammoniak verdunsten und löst den Rückstand in ungefähr 11 ccm heißem Wasser. Beim Erkalten fällt das Amid rasch wieder kristallinisch aus. Die Ausbeute an diesem gereinigten Produkt betrug 0,75 g oder 82% der Theorie. Zur Analyse wurde nochmals aus der gleichen Menge Wasser kristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1900 g Sbst.: 0,2908 g CO_2, 0,1026 g H_2O. — 0,1442 g Sbst.: 27,6 ccm N (19°, 770 mm).

$C_{11}H_{19}O_6N_5$. Ber. C 41,61, H 6,05, N 22,07.
Gef. „ 41,74, „ 6,05, „ 22,30.

Das Amid schmilzt beim raschen Erhitzen gegen 268° (korr. 275°) unter Zersetzung.

Mit Alkali und Kupfersalz gibt es die rotviolette Biuretfärbung.

Triglycylglycincarbonsäure,

$HO_2C.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$.

2 g Carbäthoxyltriglycylglycinester wurden mit 13 ccm Normal-Natronlauge (etwas mehr als der für 2 Moleküle berechneten Menge) auf 80° erhitzt, wobei bald klare Lösung eintrat. Nach 3 Stunden wurde die Flüssigkeit abgekühlt und mit 13 ccm Normalsalzsäure ver-

setzt, worauf ziemlich bald die Kristallisation der neuen Säure begann. Ihre Menge betrug nach zweistündigem Stehen 0,85 g, und die Mutterlauge gab noch 0,1 g, so daß die Gesamtausbeute 57% der Theorie erreichte. Das Rohprodukt wurde zweimal aus etwas mehr als der zehnfachen Menge Wasser umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1904 g Sbst.: 0,2597 g CO_2, 0,0838 g H_2O. — 0,1506 g Sbst.: 25,2 ccm N (18°, 773 mm).

$C_9H_{14}O_7N_4$. Ber. C 37,21, H 4,89, N 19,30.
Gef. „ 37,20, „ 4,93, „ 19,68.

Die Säure schmilzt im Kapillarrohr, rasch erhitzt, gegen 230° (korr. 235°) unter Zersetzung. In Alkohol ist sie äußerst schwer löslich. Die wässerige Lösung reagiert stark sauer und gibt mit Alkali und Kupfersalz eine blauviolette Färbung.

β-Naphtalinsulfoglycylglycin,
$C_{10}H_7SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$.

Zur Bereitung des Chlorids wird das β-Naphtalinsulfoglycin[1]) mit der dreifachen Menge Thionylchlorid bis zur Lösung erwärmt und das überschüssige Thionylchlorid unter stark vermindertem Druck bei 40° verdampft. Den festen Rückstand löst man in ungefähr der zwölffachen Menge Chloroform und gießt dann in eine Chloroformlösung von etwas mehr als 2 Molekülen Glycinester. Nach kurzer Zeit erfolgt die Abscheidung von salzsaurem Glycinester. Man verdampft das Chloroform, ohne zu filtrieren, und wäscht den Rückstand zur Entfernung des Glycinesters und seines Hydrochlorats mit wenig Wasser. Dabei bleibt eine amorphe, zähe Masse zurück. Man kann daraus durch Umlösen in viel heißem Wasser ein Produkt isolieren, welches in außerordentlich kleinen Prismen kristallisiert, bei 118—119° (korr. 119—120°) schmilzt und den Stickstoffgehalt des β-Naphtalinsulfoglycylglycinesters zeigte.

0,1603 g Sbst.: 10,9 ccm N (21°, 774 mm).

$C_{16}H_{18}O_5N_2S$. Ber. N 8,00. Gef. N 7,89.

Die Substanz wurde aber wegen der geringen Menge und des untergeordneten Interesses nicht näher untersucht.

In viel besserer Ausbeute läßt sich das β-Naphtalinsulfoglycylglycin selbst gewinnen. Zu dem Zweck wird die amorphe Masse, die beim Verdampfen der Chloroformlösung bleibt, mit sehr verdünnter Natronlauge verseift. Bei Anwendung von 2 g Naphtalinsulfoglycin

---

[1]) E. Fischer und P. Bergell, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3780 [1902]. (*S. 197.*)

wurde eine Mischung von 20 ccm Normal-Natronlauge und 30 ccm Wasser angewandt. Dabei ging das harzige Produkt größtenteils in Lösung. Nach 20-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die alkalische Lösung von einem geringen Rückstand abfiltriert und mit verdünnter Salzsäure übersättigt. Dabei fiel ein gallertartiger Niederschlag, der sich bald zu Flocken zusammenballte. Beim Umlösen aus 100 ccm heißem Wasser resultierte zunächst ein Produkt von ähnlichen Eigenschaften. Als dasselbe aber in 15 ccm heißem Alkohol gelöst war, schieden sich beim Erkalten kleine, aber ganz hübsch ausgebildete Kriställchen ab, die getrocknet den Schmp. 177—179° (korr. 180—182°) und auch den Stickstoffgehalt des bereits bekannten β-Naphtalinsulfoglycylglycins zeigten. Für die Analyse war bei 100° getrocknet.

0,1959 g Sbst.: 14,8 ccm N (19°, 759 mm).

$C_{14}H_{14}O_5N_2S$. Ber. N 8,69. Gef. N 8,67.

β-Naphtalinsulfoglycylalanin,
$C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

Die Darstellung war genau dieselbe wie bei der vorigen Verbindung. Angewandt wurden 5 g β-Naphtalinsulfoglycin, 15 ccm Thionylchlorid und 5 g optisch-inaktiver Alaninester. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 5 g und nach dem Umlösen aus 150 ccm heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle 3,5 g. Für die Analyse war im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1866 g Sbst.: 0,3689 g CO_2, 0,0805 g H_2O. — 0,1827 g Sbst.: 0,3612 g CO_2, 0,0794 g H_2O. — 0,1822 g Sbst.: 0,3606 g CO_2, 0,0795 g H_2O. — 0,1818 g Sbst.: 13,3 ccm N (20°, 766 mm).

$C_{15}H_{16}O_5N_2S$.	Ber. C 53,54,	H 4,78,	N 8,33.
	Gef. „ 53,92, 53,92, 53,96,	„ 4,84, 4,87, 4,89,	„ 8,44.

Alle drei Analysen, zu denen Präparate verschiedener Herkunft dienten, haben 0,4% zu viel Kohlenstoff ergeben. Die Ursache dieser Abweichungen konnte nicht ermittelt werden. Die Verbindung löst sich leicht in kaltem, verdünntem Ammoniak und schmilzt bei 169 bis 170° (korr. 172—173°). Sie kristallisiert aus heißem Wasser in mikroskopischen, winzigen Prismen. In Alkohol ist sie schon in der Kälte leicht löslich, dagegen wird sie schwer von Äther, Benzol, Chloroform aufgenommen.

Zum Schluß sage ich Herrn Dr. Leuchs für die eifrige Hilfe, die er mir bei den vorstehenden Versuchen leistete, besten Dank.

23. Emil Fischer und Erich Otto: Synthese von Derivaten einiger Dipeptide[1].

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **36**, 2106 (1903).
(Eingegangen am 18. Juni.)

Die in der vorhergehenden Abhandlung erwähnte Methode zum Aufbau von Polypeptiden läßt sich auch auf die Carbäthoxylderivate der einfachen Aminosäuren anwenden. So wird das Carbäthoxylglycin leicht von Thionylchlorid angegriffen, und das hierbei entstehende Chlorid, das in Äther leicht löslich ist, aber nicht kristallisiert, reagiert energisch mit den Estern der Aminosäuren. Außer den schon bekannten Verbindungen Carbäthoxylglycylglycinester und Carbäthoxyldiglycylglycinester konnte auf diesem Wege auch ein gemischtes Dipeptid, das Carbäthoxylglycylalanin nebst Ester und Amid gewonnen werden. Da die Verwandlung der so resultierenden Verbindungen in die einfachen Polypeptide wegen der starken Bindung der Kohlensäure gleichfalls nicht möglich war, so haben wir noch folgenden, ganz anderen Weg zur Darstellung von Polypeptiden eingeschlagen. Chloracetylchlorid vereinigt sich mit Alaninester sehr leicht zu Chloracetylalaninester. Behandelt man dieses Produkt mit alkoholischem Ammoniak, so wird das Chlor durch Amid ersetzt. Da aber gleichzeitig Alkoholabspaltung und Ringschluß eintritt, so resultiert das Glycylalaninanhydrid von der Formel $\begin{matrix} NH.CH_2 \text{——} CO \\ \cdot \qquad\qquad \cdot \\ CO.CH(CH_3).NH \end{matrix}$, welches das erste aus zwei verschiedenen aliphatischen Aminosäureresten zusammengesetzte Diacipiperazin ist. Durch Anwendung dieses Verfahrens auf den Glycylglycinester gelang es, den Chloracetylglycylglycinester, $Cl.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5$, und daraus durch vorsichtige Verseifung das Chloracetylglycylglycin, $Cl.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$, zu bereiten. Wird dieses endlich mit konzentriertem, wässerigem Ammoniak

[1]) Nach dem frühzeitigen und plötzlichen Tode des Herrn Otto sind mehrere der nachfolgend beschriebenen Versuche von meinem Assistenten, Herrn Dr. Leuchs, durchgeführt worden, wofür ich ihm herzlichen Dank sage. E. Fischer.

erwärmt, so resultiert kein Diacipiperazinderivat, sondern ein Produkt, das wir nach den bisher vorliegenden Beobachtungen für das einfache Tripeptid, $NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$, halten. Diese Reaktion, die für die Synthese von Tripeptiden der verschiedensten Art viele Aussicht besitzt, soll noch eingehend untersucht werden.

Carbäthoxylglycinester, $C_2H_5.CO_2.NH.CH_2.CO_2.C_2H_5$.

Zu einer stark gekühlten Lösung von 5 g Glykocollesterchlorhydrat in 5 ccm Wasser werden 3,6 ccm 10-fach normaler Natronlauge und darauf 4 g chlorkohlensaures Äthyl langsam zugesetzt. Das Gemisch wird anhaltend geschüttelt unter allmählichem Zusatz einer Lösung von 2 g trockner Soda in 10 ccm Wasser. Sobald die Kohlensäure-Entwickelung aufhört, scheidet man das obenauf schwimmende Öl ab, trocknet es mit entwässertem Natriumsulfat und destilliert unter stark vermindertem Druck. Der neue Ester geht bei 16 mm bei 135° (12 mm 126°) über als ein farb- und geruchloses Öl. Die Ausbeute betrug 75% der Theorie, berechnet auf Glykocollesterchlorhydrat.

Zur Analyse wurde das Produkt nochmals destilliert.

0,2152 g Sbst.: 0,3783 g CO_2, 0,1423 g H_2O. — 0,2248 g Sbst.: 15 ccm N (15°, 778 mm).

$C_7H_{13}NO_4$. Ber. C 48,0, H 7,43, N 8,0.
Gef. „ 47,94, „ 7,41, „ 8,01.

Der Ester kristallisiert bei längerem Reiben und Stehen in der Kälte in anscheinend monoklinen Prismen, die bei 27—28° (korr.) schmelzen. Er ist in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln, außer in Petroläther und Wasser, leicht löslich. 1 Teil des Esters löst sich in ungefähr 10 Teilen Wasser von 20°. Die Löslichkeit nimmt bis etwa 50° ab und steigt bei höherer Temperatur wieder.

Bei der Darstellung des Esters kann man statt des Alkali $^1/_2$ Molekül Natriumcarbonat zusetzen und ohne Kühlung arbeiten; jedoch ist die Ausbeute schlechter.

Carbäthoxylglycin, $C_2H_5.CO_2.NH.CH_2.CO_2H$.

8 g Carbäthoxylglycinester werden in 90 ccm Wasser gelöst und mit 50 ccm *n*-Natronlauge versetzt. Nach 2 Stunden werden 50 ccm *n*-Salzsäure hinzugefügt und die Lösung unter stark vermindertem Druck bei 40° abgedampft. Der Rückstand wird mit Äther ausgekocht und das Filtrat mit Petroläther bis zur Trübung versetzt. Nach einigem Stehen scheidet sich die neue Säure in Kristallen ab, deren Menge sich durch Reiben vermehrt. Ausbeute 90—95% der Theorie.

Zur Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2068 g Sbst.: 0,3087 g CO_2, 0,1132 g H_2O. — 0,1590 g Sbst.: 13,4 ccm N (19°, 754 mm).

$C_5H_9NO_4$. Ber. C 40,82, H 6,12, N 9,52.
Gef. „ 40,71, „ 6,14, „ 9,68.

Die Säure kristallisiert in Prismen, die bei 75° (korr.) schmelzen. Sie reagiert und schmeckt stark sauer und ist in den gebräuchlichen Lösungsmitteln, außer Petroläther, löslich.

Sie entsteht auch direkt aus Glykocoll und chlorkohlensaurem Äthyl. 3 g Glykocoll werden in 15 ccm Wasser gelöst, mit 4 ccm 10-fach normaler Natronlauge mit 4,5 g chlorkohlensaurem Äthyl geschüttelt, mit 2 g trockner Soda versetzt und wieder geschüttelt, bis das Öl verschwunden ist. Die Lösung wird mit 7,5 ccm verdünnter Salzsäure (von 15%) versetzt, unter vermindertem Druck eingedampft und das Carbäthoxylglycin, wie oben angegeben, aus dem Rückstand isoliert. Die Ausbeute betrug 78% der Theorie, berechnet auf die angewandte Menge Glykocoll.

Das Carbäthoxylglycin liefert einige charakteristische Salze. Löst man die Säure in Ammoniak und verjagt den Überschuß der Base durch Kochen, so gibt diese neutrale Flüssigkeit in der Kälte mit Silbernitrat einen farblosen Niederschlag, der aus äußerst feinen, in warmem Wasser ziemlich leicht löslichen Nädelchen besteht; mit Bleiacetat ebenfalls eine kristallinische Fällung, die unter dem Mikroskop eisblumenartig aussieht und sich in heißem Wasser ebenfalls leicht löst. Viel schwerer löslich ist der Niederschlag, den Quecksilberoxydulnitrat in der Lösung des Ammoniumsalzes erzeugt. Er löst sich erst in viel heißem Wasser unter Rücklassung eines geringen schwarzen Produktes und kristallisiert beim Erkalten in langen, feinen Nadeln. Eisenchlorid erzeugt in der Lösung des Ammoniumsalzes erst eine ölige Trübung, die aber bei Überschuß von Eisenchlorid wieder mit dunkelroter Farbe in Lösung geht. Die wässerige Lösung der freien Säure nimmt beim Kochen reichliche Mengen von Kupferoxyd mit blauer Farbe auf, welche aber viel schwächer ist, als die des Glykocollkupfers.

Die Verseifung des Carbäthoxylglycins zur entsprechenden Glycylcarbonsäure ist uns leider nicht gelungen, weil Alkalien erst bei höherer Temperatur angreifen und dann Abspaltung von Kohlensäure veranlassen.

Carbäthoxylglycinamid, $C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH_2$.

7 g Carbäthoxylglycinester werden mit dem doppelten Volumen flüssigem Ammoniak im Rohr eingeschlossen und 2 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach dem Öffnen des Rohres und Verdunsten

des Ammoniaks bleibt eine glänzende, weiße Kristallmasse zurück. Sie wird in warmem Aceton gelöst und durch langsamen Zusatz von Petroläther wieder abgeschieden. Das hierbei in prachtvoll glänzenden Kristallen ausfallende Amid ist rein. Zur Analyse wurde es im Vakuum getrocknet.

0,1676 g Sbst.: 0,2527 g CO_2, 0,1035 g H_2O. — 0,1344 g Sbst.: 22, 5ccm N (19⁰, 760 mm).

$C_5H_{10}N_2O_3$. Ber. C 41,09, H 6,85, N 19,18.
Gef. „ 41,12, „ 6,86, „ 19,25.

Das Amid kristallisiert in dünnen Blättern, die gegen 95⁰ anfangen zu sintern und bei 101—103,5⁰ (korr.) schmelzen. Es ist in Wasser, Alkohol, Essigäther, Aceton leicht löslich, etwas schwerer in Chloroform, sehr schwer in Äther, fast unlöslich in Petroläther. Es gibt mit Alkali und wenig Kupfersulfat eine ins Violette spielende Blaufärbung. Beim Stehen in wässeriger Lösung mit 1 Molekül Normal-Alkali bei Zimmertemperatur entwickelt es Ammoniak; es bildet sich wenig Carbäthoxylglycin, der Rest des Amids ist unverändert. Zum Unterschiede von dem isomeren Hydantoïnsäureester läßt sich das Amid nicht in Hydantoïn verwandeln. Beim Eindampfen mit 25-prozentiger Salzsäure bildet sich Chlorammonium und Carbäthoxylglycin. Auch bei 4—6-stündigem Erhitzen auf 110—160⁰ entstehen zwar ölige Produkte, aber kein Hydantoïn.

Carbäthoxylglycinchlorid.

5 g Carbäthoxylglycin werden im Destillationskolben mit 5 g Thionylchlorid übergossen. Beim Erwärmen auf 35—40⁰ tritt unter Entwickelung von Salzsäure und schwefliger Säure allmählich Lösung ein. Man erhitzt alsdann eine Minute auf dem Wasserbade und entfernt das überschüssige Thionylchlorid unter stark vermindertem Druck bei 35 bis 40⁰. Das zurückbleibende, schwach gelb gefärbte Öl wird in 35 ccm absolutem Äther gelöst und filtriert.

Das Produkt ist als Säurechlorid durch das Verhalten gegen Wasser und Alkohol gekennzeichnet, denn es setzt sich damit um in Carbäthoxylglycin bzw. Carbäthoxylglycinester. Es ist nicht destillierbar und kristallisiert nicht, ist in Äther und Chloroform leicht löslich, in Petroläther unlöslich. Bei längerem Stehen über Natronkalk zersetzt es sich. Die ätherische Lösung ist beständig.

Neue Synthese des Carbäthoxylglycylglycinesters.

5 g Carbäthoxylglycin werden, wie zuvor beschrieben, chloriert, in 35 ccm absolutem Äther gelöst und tropfenweise unter Kühlung in eine Lösung von 6,5 g Glykocollester in 13 ccm absolutem Äther ein-

getragen. Die sich abscheidende Kristallmasse wird mit wenig kaltem Wasser ausgewaschen, der Rückstand in Benzol gelöst und mit Petroläther gefällt. Das so erhaltene Produkt zeigte den Schmp. 87° und die übrigen Eigenschaften des Carbäthoxylglycylglycinesters. Die Ausbeute war 60%, berechnet auf die angewandte Menge Carbäthoxylglycin. Der wässerige Auszug enthält salzsauren Glykocollester.

Neue Synthese des Carbäthoxyldiglycylglycinesters.

15 g Carbäthoxylglycin werden chloriert, in 100 ccm absolutem Äther gelöst und langsam unter Schütteln zu einer Lösung von 25 g Glycylglycinester in etwa 100 ccm Chloroform gefügt. Der entstehende dicke Brei wird auf dem Wasserbade zur Trockne abgedampft und der Rückstand in 60 ccm heißem Wasser gelöst. Aus der event. mit Tierkohle entfärbten Lösung scheidet sich beim Erkalten allmählich der Carbäthoxyldiglycylglycinester in Schuppen ab. Die Ausbeute betrug 90%, auf Glycylglycinester berechnet.

0,1463 g Sbst.: 18,0 ccm N (18°, 777 mm).

$C_{11}H_{19}N_3O_6$. Ber. N 14,53. Gef. N 14,54.

Der Schmelzpunkt wurde wie früher für das auf anderem Wege gewonnene Präparat bei 160—161° (korr. 162—163°) gefunden.

Diese Darstellungsmethode ist der in der vorigen Abhandlung beschriebenen weit vorzuziehen.

Carbäthoxylglycylalaninester,

$C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).CO_2C_2H_5$.

5,5 g Carbäthoxylglycin werden chloriert, in 38 ccm absolutem Äther gelöst und langsam zu einer Lösung von 9 g Alaninester in 50 ccm absolutem Äther gefügt. Hierbei fällt salzsaurer Alaninester als Sirup aus und erstarrt beim Reiben und Abkühlen. Die ätherische Lösung hinterläßt beim Eindunsten den neuen Ester auch als Sirup, der beim Reiben und Abkühlen ebenfalls kristallisiert. Die Masse wird mit einem Gemisch von 1 Teil Äther und 1 Teil Petroläther durchgerieben und ausgewaschen. Ausbeute 7 g oder 77%, auf Carbäthoxylglycin berechnet. Das Produkt wird in wenig Äther gelöst und Petroläther bis zur schwachen Trübung zugesetzt. Nach einigem Stehen beginnt die Kristallisation des Esters und wird durch Zusatz von Petroläther vervollständigt.

Zur Analyse war das Präparat nochmals aus Äther umkristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1806 g Sbst.: 0,3224 g CO_2, 0,1210 g H_2O. — 0,1940 g Sbst.: 19,1 ccm N (18,5°, 754 mm).

$C_{10}H_{18}N_2O_5$. Ber. C 48,78, H 7,32, N 11,38.
Gef. „ 48,68, „ 7,51, „ 11,25.

Der Ester kristallisiert in sternförmig verwachsenen, feinen Nadeln, die von 62° an sintern und bei 65,5—66,5° (korr.) schmelzen. Er ist in allen gewöhnlichen Lösungsmitteln, außer Petroläther, leicht löslich.

Carbäthoxylglycylalaninamid,
$C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).CO.NH_2$.

7 g Carbäthoxylglycylalaninester werden mit dem gleichen Volumen flüssigem Ammoniak 2 Tage im Rohr eingeschlossen. Es tritt Lösung ein. Nach Verdunsten des Ammoniaks über Natronkalk bleibt ein Sirup zurück, der, mit einem Gemisch von 1 Teil Alkohol und 2 Teilen Äther behandelt, kristallinisch wird. Ausbeute 5 g oder 80% der Theorie.

Zur Analyse wurde die Substanz aus Alkohol umkristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1970 g Sbst.: 0,3189 g CO_2, 0,1211 g H_2O. — 0,1786 g Sbst.: 29,8 ccm N (19°, 766 mm).

$C_8H_{15}N_3O_4$. Ber. C 44,24, H 6,91, N 19,35.
Gef. „ 44,15, „ 6,89, „ 19,34.

Das Amid kristallisiert in Nadeln, die zwillingsartig verwachsen sind. Schmp. 136,5—137,5° (korr.). Es gibt eine starke, rotviolette Biuretreaktion. Es ist in Wasser leicht löslich, schwerer in Alkohol, sehr schwer in Äther.

Carbäthoxylglycylalanin,
$C_2H_5CO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).CO_2H$.

1,25 g Carbäthoxylglycylalaninester werden in 25 ccm Wasser gelöst, mit 5 ccm Normal-Natronlauge versetzt, nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur mit 5 ccm Normal-Schwefelsäure neutralisiert und die Lösung unter stark vermindertem Druck eingedampft. Den Rückstand extrahiert man mit 25 ccm heißem Alkohol, verdampft das Filtrat unter vermindertem Druck und löst in wenig heißem Wasser. Beim Erkalten fällt die Säure aus. Ausbeute 0,9 g oder 81% der Theorie.

Zur Analyse wurde die Substanz nochmals aus Wasser umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2289 g Sbst.: 0,3678 g CO_2, 0,1325 g H_2O. — 0,1224 g Sbst.: 13,4 ccm N (18°, 777 mm).

$C_8H_{14}N_2O_5$. Ber. C 44,04, H 6,42, N 12,84.
Gef. „ 43,82, „ 6,43, „ 12,94.

Die Säure kristallisiert in langen Nadeln, schmilzt bei 185—186° (korr.) 187,5—188,5°) und reagiert stark sauer.

Chloracetylalaninester, $ClCH_2.CO.NH.CH(CH_3).CO_2C_2H_5$.

10 g Chloracetylchlorid, mit 60 ccm absolutem Äther vermischt, werden allmählich unter Kühlung und Schütteln in eine Lösung von 20 g Alaninester in 60 ccm absolutem Äther eingetragen. Dabei scheidet sich salzsaurer Alaninester als Kristallmasse ab. Die ätherische Lösung hinterläßt beim Verdampfen einen Sirup, der beim Abkühlen und Reiben kristallisiert. Die Masse wird in wenig Äther gelöst, Petroläther bis zur Trübung zugesetzt und die bald ausfallenden Kristalle mit 5 ccm Wasser erhitzt. Die Masse schmilzt und ein Teil — die Chloressigsäure — geht in Lösung; man dekantiert und wäscht in wenig Wasser, bis die saure Reaktion verschwindet. Das zurückbleibende Öl wird in wenig Äther gelöst und mit Petroläther zum Kristallisieren gebracht.

Ausbeute 10 g oder 60%, auf die Hälfte des Alaninesters berechnet.

Zur Analyse wurde das Produkt nochmals in Äther gelöst, mit Petroläther gefällt und über Schwefelsäure getrocknet.

0,2431 g Sbst.: 0,3860 g CO_2, 0,1359 g H_2O. — 0,2593 g Sbst.: 17 ccm N (20°, 762 mm). 0,1990 g Sbst.: 0,1473 g AgCl.

$C_7H_{12}NO_3Cl$. Ber. C 43,41, H 6,22, N 7,25, Cl 18,39.
Gef. „ 43,31, „ 6,21, „ 7,52, „ 18,31.

Der Ester kristallisiert in langen Nadeln und Tafeln mit Pyramidenflächen. Schmp. 48,5—49,5° (korr.). Er ist in ungefähr 15 Teilen Wasser löslich. In Alkohol, Essigäther, Aceton, Chloroform, Äther leicht, in Petroläther sehr schwer löslich. Er gibt beim Kochen mit Alkalien oder Ammoniak sein Chlor ab. Eine mit Silbernitrat versetzte Lösung trübt sich schon in der Kälte allmählich.

Glycin-Alanin-Anhydrid (Methyldiacipiperazin),

```
      CH2—CO
HN<          >NH .
      CO——CH.CH3
```

2 g Chloracetylalaninester werden mit 20 ccm alkoholischem Ammoniak, das bei 0° gesättigt ist, im Rohr 4 Stunden auf 100° erwärmt. Man verdampft alsdann Ammoniak und Alkohol auf dem Wasserbade und laugt den Rückstand im Soxhlet'schen Extraktionsapparat mit 150 ccm Aceton aus. Das Aceton wird auf dem Wasserbade verdampft, der Rückstand in wenig heißem Alkohol gelöst und mit Tierkohle ent-

färbt. Das genügend konzentrierte Filtrat erstarrt allmählich zu einem Brei glänzender Kristalle. Ausbeute 1 g oder 75% der Theorie.

Zur Analyse wurde nochmals aus Alkohol umkristallisiert und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

0,1693 g Sbst.: 0,2904 g CO_2, 0,0976 g H_2O. — 0,1453 g Sbst.: 28,2 ccm N (20°, 749 mm).

$C_5H_8N_2O_2$. Ber. C 46,88, H 6,25, N 21,88.
Gef. „ 46,78, „ 6,41, „ 21,88.

Das Anhydrid kristallisiert in feinen Nadeln. Es färbt sich beim Erhitzen bei 236° braun und schmilzt beim raschen Erhitzen unter Zersetzung bei 238—239° (korr. 244—245°). Es ist in Wasser und heißem Alkohol leicht löslich, schwer in Aceton. Es reagiert neutral und ist geschmacklos.

Chloracetylglycylglycinester.

Fügt man allmählich eine Lösung von 5,3 g Chloracetylchlorid in 35 ccm Chloroform zu einer Lösung von 7,5 g Glycylglycinester in 60 ccm Chloroform, so erwärmt sich das Gemisch, und nach einiger Zeit tritt Kristallisation ein. Diese abzuwarten, ist aber nicht nötig. Man kann vielmehr das Chloroform alsbald verdampfen und den kristallinischen Rückstand mit Äther waschen, um unzersetztes Chlorid zu entfernen. Man extrahiert dann den Rückstand mit 150 ccm heißem Chloroform und erhält beim Verdampfen etwa 4 g des neuen Körpers.

Das Produkt läßt sich leicht durch Umlösen aus Aceton, Chloroform oder Alkohol reinigen. So geben 3,7 g Rohprodukt, aus 70 ccm Aceton umgelöst, 3 g reines Präparat vom Schmp. 151—152° (korr. 153—154°), das für die Analyse im Vakuum getrocknet war.

0,1911 g Sbst.: 0,2844 g CO_2, 0,0985 g H_2O. — 0,1935 g Sbst.: 0,1167 g AgCl. — 0,1902 g Sbst.: 19,1 ccm N (17°, 762 mm).

$C_8H_{13}O_4N_2Cl$. Ber. C 40,58, H 5,54, N 11,83, Cl 15,00.
Gef. „ 40,60, „ 5,77, „ 11,69, „ 14,93.

Der Ester kristallisiert in Nadeln.

Mit alkoholischem Ammoniak auf 100° erhitzt liefert er eine farblose, in Wasser ziemlich schwer lösliche Masse, die starke Biuretreaktion zeigt und noch der näheren Untersuchung bedarf.

Chloracetylglycylglycin.

4 g fein gepulverter Chloracetylglycylglycinester werden mit 18,4 ccm Normal-Natronlauge (1,1 Mol.) bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt, wobei er sich unter schwacher Erwärmung in wenigen

Minuten zur entsprechenden Säure löst. Diese scheidet sich auf Zugabe von 18,4 ccm Normal-Salzsäure sofort aus der Flüssigkeit ab. Nach einstündigem Stehen bei 0° betrug ihre Menge 2,5 g. Durch Eindampfen der Mutterlauge unter stark vermindertem Druck wurden noch 0,9 g gewonnen. Zur Reinigung des Rohproduktes genügt einmaliges Umlösen aus der vierfachen Menge heißem Wasser. Für die Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,2047 g Sbst.: 0,2591 g CO_2, 0,0817 g H_2O. — 0,1828 g Sbst.: 20,4 ccm N (15°, 773 mm).

$C_6H_9O_4N_2Cl$. Ber. C 34,52, H 4,36, N 13,42.
Gef. „ 34,52, „ 4,47, „ 13,29.

Die Säure schmilzt im Kapillarrohr bei 175—177° (korr. 178 bis 180°) und färbt sich gleichzeitig braun.

Sie kristallisiert aus Wasser in mikroskopisch kleinen Prismen, ist leicht löslich in heißem Alkohol, woraus sie gut kristallisiert, dann successiv schwerer löslich in Aceton, Chloroform und Äther.

Erhitzt man diese Säure mit der zehnfachen Menge wässerigem Ammoniak von 25% eine Stunde auf 100° und verdampft dann auf dem Wasserbad, so bleibt ein Sirup, der beim Erkalten bald erstarrt. Wird er wieder in wenig Wasser gelöst und dann Alkohol zugegeben, so scheidet sich eine ölige Masse ab, die bald zu mikroskopischen Nädelchen erstarrt. Beim Wiederholen dieses Verfahrens erhält man ein chlorfreies Präparat, welches wir nach der Analyse und den Eigenschaften für das gesuchte Diglycylglycin,

$$NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H,$$

halten. Eine ausführliche Untersuchung des Präparates soll darüber entscheiden.

Anhangsweise mögen hier noch 2 bisher unbekannte Verbindungen beschrieben werden, die für andere, erfolglos gebliebene, synthetische Versuche bereitet wurden.

Acetylalanin, $CH_3.CO.NH.CH(CH_3).CO_2H$.

Die folgende Darstellungsweise ist der Bereitung des Acetylleucins aus Leucinester[1]) nachgebildet. 5 g Alaninester werden in 10 g Essigsäureanhydrid eingetragen und 5 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Zusatz von 30 ccm Wasser und kurzem Erwärmen wird Wasser und Essigsäure unter stark vermindertem Druck aus einem Bade von 50—60° abdestilliert. Der zurückbleibende Sirup wird

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 449 [1901]. (*S. 190.*)

in 40 ccm Wasser gelöst und bleibt eine Stunde auf Zusatz von 50 ccm Normal-Natronlauge stehen. Dann gibt man 50 ccm Normal-Salzsäure hinzu und dampft unter stark vermindertem Druck ein. Der Rückstand wird mit 30 ccm heißem Alkohol ausgezogen, der Alkohol unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand in Aceton gelöst. Aus der erkaltenden Lösung fällt der größte Teil der Säure aus; ein kleiner Teil kann aus der Mutterlauge noch gewonnen werden. Ausbeute 5 g oder 80% (auf Alaninester berechnet).

Zur Analyse wurde das Produkt nochmals aus Aceton umkristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet.

0,2537 g Sbst.: 0,4250 g CO_2, 0,1546 g H_2O. — 0,2773 g Sbst.: 25,2 ccm N (18°, 778 mm).

$C_5H_9NO_3$. Ber. C 45,80, H 6,87, N 10,69.
Gef. „ 45,70, „ 6,77, „ 10,76.

Die Säure kristallisiert in anscheinend rhombischen Tafeln, Schmp. 137° (korr. 137,5°). Sie reagiert und schmeckt stark sauer. Sie ist in Wasser und Alkohol leicht löslich, dann steigend schwerer löslich in Aceton und Äther.

Die beabsichtigte Chlorierung mit Phosphorchloriden oder Thionylchlorid gelang nicht, da trotz vielfacher Abänderung der Versuchsbedingungen stets phosphor- bzw. schwefelhaltige, amorphe Produkte entstanden.

Acetylglycylglycin,
$CH_3.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H$.

8 g des schon bekannten Acetylglycylglycinesters[1]) werden fein gepulvert und durch Schütteln in 20 ccm Wasser bei gewöhnlicher Temperatur gelöst. Dazu fügt man allmählich 44 ccm Normal-Natronlauge (1,1 Molekül), wobei schwache Erwärmung eintritt, läßt das Gemisch eine Stunde stehen, fügt dann 44 ccm Normal-Salzsäure zu, verdampft unter stark vermindertem Druck zur Trockne und kocht den Rückstand mit 150 ccm Alkohol aus. Wird die alkoholische Lösung bis auf 20 ccm eingeengt, so fällt der größte Teil der neuen Säure beim Abkühlen kristallinisch aus. Die Ausbeute betrug 5,5 g. Durch Umlösen aus 60 ccm heißem Alkohol wurden daraus 4,2 g reines Präparat gewonnen. Für die Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,1738 g Sbst.: 0,2650 g CO_2, 0,0918 g H_2O. — 0,1086 g Sbst.: 15,4 ccm N (18°, 746 mm).

$C_6H_{10}O_4N_2$. Ber. C 41,36, H 5,80, N 16,12.
Gef. „ 41,58, „ 5,92, „ 16,04.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1101 [1902]. (*S. 296.*)

Die Säure schmilzt bei 184—186° (korr. 187—189°), nachdem sie kurz vorher gesintert ist. Sie schmeckt und reagiert sauer, löst sich sehr leicht in Wasser und successive schwerer in Alkohol, Aceton und Äther. Aus heißem Alkohol kristallisiert sie in schwachen Tafeln, die häufig wie dünne, an den Enden zugespitzte Prismen aussehen.

---

24. Emil Fischer und Erich Otto: Nachtrag zu der Abhandlung: Synthese von Derivaten einiger Dipeptide[1].

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **36**, 2993 (1903).
(Eingegangen am 7. August.)

In obiger Abhandlung haben wir leider versäumt, anzuführen, daß der Carbäthoxylglycinester und das daraus entstehende Carbäthoxylglycin bereits von Hantzsch und Metcalf[2]) unter den Namen Urethanessigester und Urethanessigsäure beschrieben sind. Durch unsere Versuche werden die Beobachtungen jener Herren in allen wesentlichen Punkten bestätigt und in mancher Beziehung auch ergänzt.

Ferner bemerken wir, daß das ebendaselbst erwähnte Acetylalanin auf etwas anderem Wege von De Jong[3]) aus Alanin und Essigsäureanhydrid bereitet wurde.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2106 [1903].
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **29**, 1681 [1896].
[3]) Rec. Trav. chim. Pays-Bas **19**, 288 [1900].

---

25. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden I.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 36, 2982 (1903).
(Eingegangen am 7. August.)

Sieht man ab von den Dipeptiden wie Glycylglycin oder Leucylleucin, die durch Aufspaltung der Diacipiperazine mit Säuren erhalten werden, so liefern die bisher bekannten Synthesen nur Derivate der Polypeptide, von denen die Carbäthoxyl- und Carboxylverbindungen am ausführlichsten untersucht sind. Da die Abspaltung von Kohlensäure aus ihnen ohne tiefergehende Zersetzung nicht gelungen ist, so war zum Aufbau der höheren Polypeptide eine neue Methode erforderlich. Wie bereits in der Mitteilung von Erich Otto und mir[1]) kurz erwähnt ist, hat sich diese gefunden in der Kombination folgender Reaktionen: Der Ester eines Dipeptids, z. B. der Glycylglycinester, wird mit einem halogenisierten Säurechlorid, wie Chloracetylchlorid, zusammengebracht. Aus dem so resultierenden Chloracetylglycylglycinester läßt sich durch vorsichtige Verseifung mit Alkali die entsprechende Säure $Cl.CH_2.CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$ bereiten; wird letztere mit starkem, wässerigem Ammoniak erwärmt, so entsteht das Diglycylglycin von der Strukturformel $NH_2CH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$, der erste Repräsentant der einfachen Tripeptide. Diese Verbindung ist dem Glycylglycin sehr ähnlich, sie bildet ein schwer lösliches, blaues Kupfersalz, läßt sich mit Salzsäure und Alkohol verestern und wird durch Chlorkohlensäureester in das früher[2]) beschriebene, auf ganz anderem Wege gewonnene Carbäthoxyldiglycylglycin verwandelt. Auf die gleiche Art lassen sich gemischte Tripeptide erzeugen. So wurde durch Verwendung von α-Brompropionylbromid ein Alanylglycylglycin und mittels α-Bromisocapronylchlorid ein Leucylglycylglycin dargestellt. Eine für die praktische Ausführung wesentliche Vereinfachung hat die Methode durch die Beobachtung erfahren, daß man in den beiden

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 36, 2107 [1903]. (*S. 315.*)
[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 36, 2100 [1903]. (*S. 308.*)

letzten Fällen das Säurechlorid oder Bromid auch direkt mit dem Glycylglycin in alkalischer Lösung kombinieren kann.

Ich zweifle nicht daran, daß sich durch diese bequeme Synthese auch die verschiedenartigsten gemischten Dipeptide, Tetrapeptide usw. gewinnen lassen, und ich glaube, daß man mit der Erzeugung dieser reinen Polypeptide der Synthese der natürlichen Peptone um ein gutes Stück näher gekommen ist.

Diglycylglycin, $NH_2CH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

2 g des früher beschriebenen Chloracetylglycylglycins werden mit 8 ccm wässerigem Ammoniak von 25% eine halbe Stunde auf 100° erhitzt, dann die Flüssigkeit auf dem Wasserbade verdampft, um das Ammoniak zu verjagen, und der Rückstand in 10 ccm Wasser gelöst. Fügt man zur warmen Flüssigkeit 50 ccm absoluten Alkohol, so scheidet sich in der Regel zuerst eine ölige Masse ab, die aber bald zu einem kristallinischen Pulver erstarrt. Sie wurde zur Reinigung zweimal in der 10-fachen Menge Wasser gelöst und jedesmal durch Zufügen des anderthalbfachen Volumens Alkohol in Form von mikroskopisch kleinen Nädelchen wieder abgeschieden. Dabei blieb nicht allein alles Chlorammonium, sondern auch eine organische Verunreinigung in der Mutterlauge. Die Menge des reinen Körpers betrug 0,8 g oder 44% der Theorie.

Für die Analyse wurde bei 100° getrocknet:

0,1798 g Sbst.: 0,2495 g CO_2, 0,0975 g H_2O. — 0,1489 g Sbst.: 23,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 (Kjeldahl).

$C_6H_{11}O_4N_3$.	Ber.	C 38,08,	H 5,87,	N 22,22.
	Gef.	„ 37,85,	„ 6,08,	„ 22,29.

Im Kapillarrohr färbt sich die Substanz von 215° an gelb, bei höherer Temperatur braun, entwickelt gegen 240° (korr. 246°) Gas und schmilzt gleichzeitig. Sie löst sich leicht in heißem Wasser, kristallisiert aber noch aus der 10-prozentigen Lösung in der Kälte aus. In absolutem Alkohol ist sie unlöslich, desgleichen in Äther. Die wässerige Lösung reagiert neutral und schmeckt nicht süß. Sie löst gefälltes Kupferoxyd in der Hitze mit blauer Farbe. Versetzt man die Lösung des Tripeptids in der für 1 Mol. berechneten Menge Normal-Natronlauge mit Kupfersulfat, so entsteht sofort ein kristallinischer grünlicher Niederschlag, der selbst in heißem Wasser schwer löslich ist.

Das in kaltem Wasser relativ schwer lösliche Tripeptid löst sich sofort auf Zusatz von Salzsäure. Das Hydrochlorat ist auch in rauchender Salzsäure ziemlich leicht löslich, kristallisiert aber bei genügender Konzentration.

Die nicht zu verdünnte schwefelsaure Lösung wird durch Phosphorwolframsäure gefällt und zwar zunächst als amorphe, zähe Masse. In der Hitze löst sich der Niederschlag leicht, fällt aber beim Erkalten wieder; ebenso löst er sich im Überschuß der Phosphorwolframsäure.

Von alkoholischer Salzsäure wird das Tripeptid außerordentlich leicht in den Ester verwandelt, der sich in Form seines schwer löslichen Hydrochlorats abscheidet. Infolgedessen findet bei der Reaktion nur dann klare Lösung statt, wenn eine sehr große Menge von alkoholischer Salzsäure zur Anwendung kommt (etwa die 100-fache Menge). Ist das nicht der Fall, so merkt man den Verlauf der Veresterung nur an dem veränderten Aussehen der festen Masse. Die Analyse des im Vakuum getrockneten Hydrochlorats gab folgende Zahlen:

0,1818 g Sbst.: 0,2520 g CO_2, 0,1032 g H_2O. — 0,2850 g Sbst.: 11,4 ccm $^1/_{10}$ n-Cl.

$C_8H_{16}O_4N_3Cl$. Ber. C 37,87, H 6,31, Cl 14,00.
Gef. „ 37,81, „ 6,30, „ 14,20.

Das Salz schmilzt im Kapillarrohr unter Braunfärbung bei 210 bis 215° (korr. 214—219°); es ist in Wasser leicht, in Alkohol aber selbst in der Hitze sehr schwer löslich und kristallisiert daraus beim Abkühlen in sehr kleinen, anscheinend rechtwinkeligen Tafeln.

Verwandlung des Diglycylglycins in die Carbäthoxylverbindung.

0,75 g des Tripeptids wurden bei 0° in 4,1 ccm Normal-Natronlauge gelöst und nach Zusatz von 0,5 g Chlorkohlensäureester 10 Minuten lang geschüttelt. Dann wurde eine Lösung von 0,2 g Natriumcarbonat in 3 ccm Wasser zugesetzt und abermals etwa $^1/_2$ Stunde geschüttelt, bis die Entwickelung von Kohlensäure aufhörte. Gegen Ende der Reaktion trübte sich die Flüssigkeit, und nach Zusatz von 4,1 ccm Normal-Salzsäure begann die Kristallisation des Carbäthoxylderivates. Seine Menge betrug nach $^1/_2$-stündigem Stehen bei 0° 0,9 g oder 86% der Theorie. Einmal aus heißem Wasser umkristallisiert, war die Substanz rein. Sie zeigte den Schmp. 208—210° (korr. 212—214°) und die sonstigen Eigenschaften des früher[1]) beschriebenen Carbäthoxyldiglycylglycins.

Für die Analyse wurde im Vakuum getrocknet.

0,1868 g Sbst.: 0,2816 g CO_2, 0,0988 g H_2O. — 0,1748 g Sbst.: 20,05 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_9H_{15}O_6N_3$. Ber. C 41,35, H 5,82, N 16,08.
Gef. „ 41,11, „ 5,93, „ 16,06.

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2100 [1903]. *(S. 308.)*

α-Brompropionyl-glycylglycinester.

Vermischt man eine Lösung von 30 g Glycylglycinester in 120 ccm Chloroform mit 25 g käuflichem α-Brompropionylbromid in 100 ccm Chloroform, so findet Erwärmung statt, und es fällt alsbald ein Gemisch des neuen Esters und des bromwasserstoffsauren Glycylglycinesters als kristallinische Masse aus. Sie wird filtriert, die Mutterlauge stark eingedampft und mit Äther versetzt, wobei von neuem kristallinische Fällung eintritt. Die gesamte Menge des festen Produktes beträgt etwa 50 g. Es wird zuerst mit 250 ccm und dann mit 100 ccm Chloroform ausgekocht, wobei nur der Brompropionylglycylglycinester in Lösung geht. Er wird aus dem Filtrat durch Verdampfen des Chloroforms und Fällen mit Äther leicht gewonnen. Die Ausbeute betrug 22 g, während nach der Menge des Glycylglycinesters, der zur Hälfte als Salz der Reaktion entzogen wird, 27,2 g zu erwarten waren. Zur völligen Reinigung wurden die 22 g Ester aus 100 ccm heißem Wasser umkristallisiert. Bei 0° war die Abscheidung so vollständig, daß der Verlust nur 3 g betrug. Für die Analyse wurde im Vakuum getrocknet.

0,1846 g Sbst.: 0,2481 g CO_2, 0,0850 g H_2O. — 0,3948 g Sbst.: 26,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_9H_{15}O_4N_2Br$. Ber. C 36,61, H 5,08, N 9,49.
Gef. „ 36,65, „ 5,12, „ 9,40.

Der Ester sintert gegen 130° und schmilzt bei 133—134° (korr. 135—136°). Er ist in heißem Chloroform, Alkohol und Aceton leicht, in der Kälte erheblich schwerer löslich, noch schwerer wird er von Äther und Petroläther aufgenommen. Er kristallisiert aus Wasser und Alkohol in vierseitigen, schiefen Tafeln. Beim Kochen mit Wasser spaltet er langsam Bromwasserstoff ab.

α-Brompropionyl-glycylglycin, $CH_3.CHBr.CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

Übergießt man 14 g des fein gepulverten Esters mit 52 ccm n-Natronlauge (1,1 Mol.), so erfolgt nach einigen Minuten klare Lösung, und wenn nach einer Viertelstunde 52 ccm n-Säure zugesetzt werden, so beginnt alsbald die Abscheidung der neuen Säure in kleinen, schief abgeschnittenen Prismen. Ihre Menge betrug nach einstündigem Stehen der auf 0° abgekühlten Flüssigkeit 10,2 g oder 80% der Theorie, und durch Konzentration der Mutterlauge konnten noch 2 g gewonnen werden, so daß die Ausbeute fast quantitativ ist. Für die Analyse wurde die Säure aus heißem Wasser umgelöst und im Vakuum getrocknet.

0,1807 g Sbst.: 0,2069 g CO_2, 0,0695 g H_2O. — 0,3784 g Sbst.: 28,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_7H_{11}O_4N_2Br$. Ber. C 31,46, H 4,12, N 10,49.
Gef. „ 31,23, „ 4,16, „ 10,36.

Sie schmilzt bei 163—164° (korr. 166—167°) unter schwacher Gelbfärbung; sie löst sich in weniger als der doppelten Menge kochendem Wasser und in etwa 35 Teilen Wasser von Zimmertemperatur. Schwerer löslich ist sie in Aceton und Alkohol, und noch schwerer in Aceton und Äther.

Die Darstellung der Säure auf dem Umwege über den Ester ist etwas umständlich und hat auch den Nachteil, daß die Hälfte des Glycylglycinesters als Salz der Reaktion entzogen wird. Es ist deshalb erfreulich, daß man die bromhaltige Säure direkt aus dem Glycylglycin auf folgende Art bereiten kann:

5 g salzsaures Glycylglycin (kristallwasserhaltig) werden in 27,4 ccm Doppel-n-Natronlauge (2 Mol.) gelöst, dann auf 0° abgekühlt und mit einer Lösung von 6 g Brompropionylbromid in 20 ccm Chloroform geschüttelt. Zu dieser Mischung werden dann noch 21 ccm Doppel-n-Natronlauge ($1^1/_2$ Mol.) in Portionen zugegeben und das Schütteln etwa 10—15 Minuten fortgesetzt. Jetzt wird die wässerige Lösung von der Chloroformschicht getrennt, mit 35 ccm n-Salzsäure angesäuert und unter stark vermindertem Druck auf 20 ccm eingeengt. Nach dem Abkühlen auf 0° betrug die Menge des auskristallisierten α-Brompropionylglycylglycins 5,2 g oder 73% der Theorie.

Alanyl-glycylglycin,

$CH_3.CH(NH_2).CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

10 g Brompropionylglycylglycin werden mit 50 ccm Ammoniak (25%) eine halbe Stunde im Rohr auf 100° erhitzt, dann die Lösung auf dem Wasserbade zum Sirup verdampft und mit viel absolutem Alkohol, etwa 200 ccm, vermischt. Während das Bromammonium in Lösung bleibt, fällt das Tripeptid als Sirup aus, wird aber beim Reiben allmählich fest. Dieses Produkt wird nach dem Filtrieren in 15 ccm warmem Wasser gelöst und abermals mit viel Alkohol gefällt. Seine Menge beträgt dann 5,8 g. Wiederholung dieses Reinigungsverfahrens gab 5 g reines, aber kristallwasserhaltiges oder 4,3 g trocknes Tripeptid, was 57% der Theorie entspricht. Das an der Luft getrocknete Präparat enthält Wasser, welches bei 100° völlig entweicht. Der Verlust betrug 13,8%, und an der Luft nahm das getrocknete Präparat wieder 12,8% an Gewicht zu. Da aus diesen Zahlen sich kein einfaches Molekularverhältnis für das Wasser berechnen läßt, so scheint das kristallinische

Material in bezug auf das Kristallwasser nicht ganz einheitlich zu sein. Im übrigen aber ist es reines Tripeptid, denn das bei 100⁰ getrocknete Präparat gab folgende gut stimmende Werte:

0,1842 g Sbst.: 0,2791 g CO_2, 0,1070 g H_2O. — 0,2333 g Sbst.: 34,2 ccm $^1/_{10}$ *n*-NH_3.

$C_7H_{13}O_4N_3$. Ber. C 41,38, H 6,40, N 20,69.
Gef. „ 41,33, „ 6,46, „ 20,52.

Das Tripeptid färbt sich von 200⁰ an gelblich und schmilzt gegen 210⁰ (korr. 214⁰) unter Zersetzung. Es ist in Wasser viel leichter löslich als das Diglycylglycin, in Alkohol aber so gut wie unlöslich. Bei der Fällung mit Alkohol kristallisiert es in mikroskopischen, gekrümmten Nadeln. In den sonstigen Eigenschaften gleicht es durchaus dem Diglycylglycin. Aber das Kupfersalz ist auch viel löslicher. Versetzt man z. B. die Lösung in der berechneten Menge Normal-Lauge mit Kupfersulfat, so färbt sie sich tiefblau, scheidet aber keinen Niederschlag ab. Selbstverständlich ist das Alanylglycylglycin als Derivat der inaktiven α-Brompropionsäure ebenfalls optisch inaktiv. Ich glaube aber, daß man aus aktiver Brompropionsäure nach demselben Verfahren ein aktives Tripeptid erhalten würde.

Carbäthoxylalanyl-glycylglycin,

$C_2H_5CO_2.NH.CH(CH_3).CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

Um die bisher unbekannte Verbindung zu gewinnen, werden 2,2 g wasserhaltiges Tripeptid in 10,4 ccm *n*-Natronlauge gelöst und bei 0⁰ etwa 10 Minuten mit 1,3 g chlorkohlensaurem Äthyl geschüttelt. Dann werden 0,5 g trocknes Natriumcarbonat zugefügt und wiederum geschüttelt, bis die Entwickelung von Kohlensäure beendet ist. Nach Zusatz von 10,4 ccm *n*-Säure wird die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck verdampft und der feste Rückstand mit 100 ccm Aceton ausgekocht. Beim Verdampfen des Acetons bleibt ein dicker Sirup, der beim Verreiben mit Petroläther fest wird. Die Menge dieses Produktes betrug 1,8 g oder 70% der Theorie. Es wurde für die Analyse zweimal aus je 5 ccm heißem, absolutem Alkohol umkristallisiert und bestand dann aus kleinen, schief abgeschnittenen Prismen vom Schmelzpunkt 158—159⁰ (korr. 161—162⁰). Für die Analyse wurde im Vakuum getrocknet:

0,1842 g Sbst.: 0,2942 g CO_2, 0,1005 g H_2O. — 0,2300 g Sbst.: 24,6 ccm $^1/_{10}$ *n*-NH_3.

$C_{10}H_{17}O_6N_3$. Ber. C 43,63, H 6,18, N 15,25.
Gef. „ 43,56, „ 6,06, „ 15,00.

Die Verbindung ist in Wasser sehr leicht, in kaltem Alkohol und in Aceton ziemlich schwer, in Äther, Petroläther und Chloroform recht schwer löslich.

α-Bromisocapronyl-glycylglycinester,
$C_4H_9.CHBr.CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOC_2H_5$.

Beim Vermischen einer gekühlten Lösung von 30 g Glycylglycinester in 120 ccm Chloroform und von 25 g α-Bromisocapronylchlorid[1]) in 100 ccm Chloroform tritt Erwärmung ein, und nach einigen Minuten fällt salzsaurer Glycylglycinester aus. Nach etwa einer Stunde wird filtriert, die Mutterlauge stark eingedampft, bis der gebromte Ester kristallinisch ausfällt, und dann zur völligen Abscheidung Äther zugegeben. Die Ausbeute an rohem Ester betrug 30 g. Wird das Produkt in der doppelten Menge Chloroform gelöst und durch Zusatz von Äther wieder abgeschieden, so ist es für die weitere Verarbeitung rein genug.

Für die Analyse wurde es aus verdünntem Alkohol umgelöst, bis der Schmelzpunkt bei 123—124° (korr. 124—125°) lag, und im Vakuum getrocknet:

0,1807 g Sbst.: 0,2839 g CO_2, 0,1037 g H_2O. — 0,3538 g Sbst.: 20,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_{12}H_{21}O_4N_2Br$. Ber. C 42,73, H 6,23, N 8,31.
Gef. „ 42,86, „ 6,38, „ 8,11.

Die Substanz ist selbst in heißem Wasser ziemlich schwer löslich, dagegen löst sich 1 g in weniger als 2 ccm heißem Alkohol. Beim Er-

[1]) Als Material für die Bereitung des Chlorides diente die von Kahlbaum bezogene Isocapronsäure, die synthetisch aus Isoamylcyanid bereitet ist. Entsprechend der Vorschrift von Volhard-Hell-Zelinsky wurden 150 g der Säure mit 15 g rotem Phosphor vermischt und 450 g Brom im Laufe von 4 Stunden zugetropft, wobei die Masse zuletzt auf dem Wasserbade erwärmt wurde. Die über der phosphorigen Säure stehende, braun gefärbte Flüssigkeit enthält zweifellos das Bromcapronylbromid, welches für die Synthese ebenfalls brauchbar wäre. Da es sich aber schwer von dem Phosphorbromid trennen läßt, so schien es besser, erst die Säure und daraus dann das Chlorid zu bereiten. Zu diesem Zweck gießt man die Flüssigkeit in Wasser, wobei unter Erwärmung Bromphosphor und Säurebromid zerlegt werden. Nach einiger Zeit wird die als Öl ausgeschiedene Bromisocapronsäure vom Wasser getrennt, der Rest mit wenig Äther ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und nach dem Verdunsten des Äthers bei 13 mm Druck fraktioniert. Nach einem geringen Vorlauf von unveränderter Isocapronsäure ging fast die ganze Menge bei 125—135° über. Bei der zweiten Fraktionierung unter 12 mm Druck gingen 205 g von 128—131° (Thermometer ganz im Dampf) über, während theoretisch 260 g Monobromisocapronsäure entstehen konnten. Zur Bereitung des Chlorids wurde die Säure in der üblichen Weise mit überschüssigem Phosphortrichlorid erwärmt und bei der Fraktionierung unter 11—12 mm Druck das α-Bromisocapronylchlorid bei 68—71° (Thermometer ganz im Dampf) aufgefangen.

kalten fällt sie, auch wenn die Lösung doppelt so verdünnt ist, in reichlicher Menge als Nadeln aus. Auch von Aceton und Chloroform wird sie leicht, dagegen schwer von Äther und Benzol und noch schwerer von Petroläther gelöst.

α-Bromisocapronyl-glycylglycin.

Übergießt man 23 g des gepulverten Esters mit 75 ccm *n*-Natronlauge, so findet bald klare Lösung statt, und wird dann nach etwa 1/4 Stunde mit 75 ccm *n*-Säure angesäuert, so fällt die neue Säure kristallinisch aus. Die Ausbeute (20,5 g) ist fast quantitativ. Zur Reinigung wurde aus 100 ccm kochendem Wasser umgelöst und für die Analyse im Vakuum getrocknet:

0,1780 g Sbst.: 0,2545 g CO_2, 0,0890 g H_2O. — 0,2480 g Sbst.: 15,7 ccm 1/10 *n*-NH_3.

$C_{10}H_{17}O_4N_2Br$. Ber. C 38,84, H 5,50, N 9,06.
Gef. „ 38,99, „ 5,55, „ 8,86.

Die Säure schmilzt bei 142—143° (korr. 144—145°), sie ist leicht löslich in Alkohol, Aceton, Essigester und heißem Wasser, dann successive schwerer löslich in Chloroform, kaltem Wasser, Äther und Petroläther. Sie kristallisiert aus Wasser in kleinen Nadeln.

Viel bequemer ist die direkte Bereitung der Säure aus Glycylglycin. 10 g wasserhaltiges, salzsaures Glycylglycin werden bei 0° in 107 ccm *n*-Natronlauge (2 Mol.-Gew.) gelöst, dann eine Lösung von 13 g α-Bromisocapronylchlorid in 50 ccm Äther zugefügt und unter fortwährendem Umschütteln allmählich noch 78 ccm *n*-Natronlauge (1 1/2 Mol.-Gew.) eingegossen. Die Temperatur soll durch Kühlung stets unter 20° gehalten sein.

Die Operation läßt sich in 1/2 Stunde ausführen. Nachdem das unzersetzte Chlorid, welches in kleinem Überschuß angewandt ist, durch Ausäthern entfernt ist, wird die wässerige Lösung mit 24 ccm 5-fach *n*-Säure versetzt, wobei das α-Bromisocapronylglycylglycin sofort ausfällt. Nach mehrstündigem Stehen bei 0° betrug seine Menge 13,4 oder 81% der Theorie, berechnet auf salzsaures Glycylglycin. Nach Einengen der Mutterlauge auf 100 ccm schieden sich noch 0,8 g derselben Säure ab, so daß die Gesamtausbeute etwa 85% betrug.

Leucyl-glycylglycin,

$$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3}{CH_3}\!>\!CH.CH_2.CH(NH_2).CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH.$$

10 g α-Bromisocapronylglycylglycin werden mit 30 ccm bei 0° gesättigtem, wässerigem Ammoniak im Rohr 1/2 Stunde auf 100° erwärmt, dann die Flüssigkeit verdampft und der zurückbleibende,

schwach grün gefärbte Sirup in heißem, absolutem Alkohol gelöst. Beim Verdampfen dieser Lösung auf dem Wasserbade scheidet sich das neue Tripeptid schon in der Wärme kristallinisch ab und ist dann in absolutem Alkohol fast unlöslich. Es kann deshalb zur völligen Entfernung des Bromammoniums mit etwa 150 ccm absolutem Alkohol ausgekocht werden. Die Ausbeute betrug 5 g oder 63% der Theorie. Zur Analyse wurde die Substanz wiederholt in wenig Wasser gelöst und durch Alkohol wieder abgeschieden. Das farblose, aus sehr kleinen, wetzsteinartigen Kriställchen bestehende Präparat wurde für die Analyse über Schwefelsäure getrocknet.

0,1806 g Sbst.: 0,3257 g CO_2, 0,1237 g H_2O. — 0,2667 g Sbst.: 32,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_{11}H_{19}O_4N_3$. Ber. C 48,98, H 7,75, N 17,12.
Gef. „ 49,19, „ 7,72, „ 17,22.

Das Leucylglycylglycin färbt sich im Kapillarrohr gegen 215° und schmilzt gegen 230° (korr. 235°) unter Zersetzung. Es löst sich in weniger als der $2^1/_2$-fachen Menge kaltem Wasser und unterscheidet sich dadurch, ebenso wie das Alanylglycylglycin, von dem viel schwerer löslichen Diglycylglycin. Diese Zunahme der Wasserlöslichkeit bei den gemischten Polypeptiden verdient hervorgehoben zu werden, denn sie werden dadurch den natürlichen Peptonen, die ja auch aus den verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt sind, ähnlicher.

Das Tripeptid bildet ein leicht lösliches blaues Kupfersalz und verhält sich gegen Phosphorwolframsäure wie das Diglycylglycin. Es reagiert auch leicht in alkalischer Lösung mit Chlorkohlensäureester, aber die hierbei entstehende Verbindung konnte bisher nicht kristallisiert erhalten werden. Schöner ist die Verbindung mit Phenylisocyanat.

Phenylcarbamido-leucylglycylglycin,

$C_6H_5.NH.CO.NH.CH(C_4H_9).CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

2 g Leucylglycylglycin werden in 8,7 ccm n.-Natronlauge gelöst und nach dem Abkühlen auf 0° 1 g Phenylisocyanat unter kräftigem Schütteln im Laufe einer Viertelstunde zugetropft. Zuletzt scheidet sich Diphenylharnstoff ab. Aus der filtrierten Flüssigkeit fällt dann beim Ansäuern eine halbfeste, fadenziehende Masse aus. Sie wird nach Abgießen der Mutterlauge mit Essigester behandelt, wobei sie sich rasch in eine feste, leicht zerreibliche Masse umwandelt. Die Menge dieses Produktes betrug 2,6 g oder 90% der Theorie. Sie wurde zur völligen Reinigung aus der 40-fachen Menge heißem Wasser umgelöst und bei 100° getrocknet.

0,1887 g Sbst.: 0,3862 g CO_2, 0,1089 g H_2O. — 0,1660 g Sbst.: 18,1 ccm $^1/_{10}$ *n*-NH_3.

$C_{17}H_{24}O_5N_4$. Ber. C 56,05, H 6,59, N 15,39.
Gef. „ 55,82, „ 6,41, „ 15,27.

Der Körper kristallisiert aus heißem Wasser in mikroskopisch kleinen, meist sechseckigen Täfelchen und aus Aceton in schiefen, vierseitigen Tafeln oder vierseitigen, schief abgeschnittenen Prismen. Er ist leicht löslich in Alkohol, schwerer in Aceton und fast unlöslich in Äther, Chloroform und Benzol. Er schmilzt bei 178—179° (korr. 182 bis 183°).

Leucylglycylglycin-äthylester.

Übergießt man 1 g Leucylglycylglycin mit 10 ccm Alkohol, der mit gasförmiger Salzsäure gesättigt ist, so findet alsbald Lösung statt. Erwärmt man dann etwa 1 Minute zum Sieden und kühlt jetzt stark ab, so scheidet sich das Hydrochlorat des Äthylesters als Kristallbrei ab. Seine Menge betrug 90% der Theorie. Für die Analyse wurde das Salz aus der 9-fachen Menge heißem, absolutem Alkohol umgelöst und im Vakuum getrocknet.

0,1921 g Sbst.: 0,3264 g CO_2, 0,1374 g H_2O. — 0,1908 g Sbst.: 6,2 ccm $^1/_{10}$ *n*-$AgNO_3$.

$C_{12}H_{23}O_4N_2.HCl$. Ber. C 46,53, H 7,75, Cl 11,47.
Gef. „ 46,35, „ 7,95, „ 11,54.

Das Salz ist in Wasser sehr leicht löslich und schmilzt gegen 220° (korr. 225°) unter Zersetzung.

Zur Darstellung des freien Esters wurden 4,5 g des Hydrochlorats mit 50 ccm Chloroform übergossen, in einer Kältemischung gekühlt und unter starkem Schütteln erst 7,5 ccm Doppelnormalnatronlauge und dann trocknes Kaliumcarbonat zugefügt, bis das Wasser vollständig davon absorbiert war. Nach dem Abgießen des Chloroforms wurde noch mehrmals mit demselben Lösungsmittel ausgelaugt, dann die vereinigten Auszüge mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel verdampft. Der zurückbleibende Ester war ein dickes Öl, dessen Kristallisation bisher nicht gelang. Er ist in Alkohol, Wasser, Aceton leicht, dagegen in Äther und Petroläther äußerst schwer löslich und reagiert stark alkalisch.

Wird dieser Ester mit einem Überschuß von alkoholischem Ammoniak, das bei 0° gesättigt ist, 2 Stunden auf 100° erhitzt, so bleibt beim Verdampfen der Flüssigkeit wiederum ein öliges Produkt, das ich nach seinen Reaktionen für das entsprechende Amid halte. Es ist äußerst leicht löslich in Wasser, reagiert alkalisch, gibt mit Kupfer-

salzen und Alkali eine sehr starke Biuretreaktion und mit Phosphorwolframsäure auch in schwefelsaurer Lösung einen dicken, amorphen Niederschlag. In allen diesen Eigenschaften ist es den natürlichen Peptonen so ähnlich, daß mir seine genauere Untersuchung, insbesondere auch die Prüfung des Verhaltens gegen Enzyme, wünschenswert erscheint.

Bei vorstehenden Versuchen habe ich mich ebenfalls der wertvollen Hilfe des Herrn Dr. H. Leuchs erfreut, wofür ich ihm auch hier besten Dank sage.

---

26. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. II.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **37**, 2486 (1904).
(Eingegangen am 13. Juni.)

Die in der ersten Mitteilung[1]) beschriebene Methode zum Aufbau von Polypeptiden, welche darin besteht, Aminosäuren mit halogenhaltigen Säureradikalen zu kombinieren und dann das Halogen durch die Aminogruppe zu ersetzen, hat sich bei weiterer Prüfung als eine sehr fruchtbare Reaktion erwiesen; denn mit ihrer Hilfe ist es gelungen, die verschiedenartigsten Di-, Tri- und Tetrapeptide darzustellen, und in einem Falle (beim Glycin) wurde die Synthese bis zum Pentapeptid fortgeführt. Ohne Zweifel ist damit das Ende des Aufbaues noch keineswegs erreicht; denn der Verlauf der Reaktion gestaltet sich bei diesen höheren Gliedern in bezug auf technische Ausführung und Ausbeute fast noch günstiger als in den einfacheren Fällen.

Die Struktur der Polypeptide läßt sich in der Regel direkt aus der Synthese ableiten; das gilt insbesondere für die Derivate der Monoaminosäuren, auf welche sich die Untersuchung bisher hauptsächlich erstreckte. Etwas komplizierter ist die Stereochemie der Klasse. Mit Ausnahme des Glykocolls enthalten alle Aminosäuren, die in den Proteïnstoffen bisher beobachtet wurden, und um die es sich vorwiegend bei diesen Synthesen handelt, ein asymmetrisches Kohlenstoffatom. Ihre Zahl in den Polypeptiden entspricht also der Anzahl der anhydridartig verknüpften Aminosäuren (mit Ausnahme des Glykocolls), und die Berechnung der selbständigen optischen Isomeren ist durch die bekannte van't Hoffsche Formel 2^n gegeben. Zum Beispiel ein Dipeptid von der allgemeinen Formel

$$NH_2.\overset{}{\underset{*}{C}}HR.CO.NH.\underset{*}{C}HR.COOH$$

muß wegen der beiden durch Sternchen markierten asymmetrischen Kohlenstoffatome in vier aktiven Formen *d d*, *l l*, *d l* und *ld* existieren, von denen je zwei eine racemische Verbindung bilden können.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2982 [1903].

Arbeitet man mit racemischem Rohmaterial, so darf man also zwei isomere inaktive Verbindungen erwarten; und diese müssen nach der Theorie schon auftreten bei den halogenhaltigen Zwischenprodukten:

$$\underset{*}{\mathrm{Br.CHR}}\mathrm{.CO.NH.}\underset{*}{\mathrm{CHR}}\mathrm{.CO_2H}\,.$$

In einzelnen Fällen (z. B. beim Leucylphenylalanin nach Versuchen von Dr. Leuchs und Prof. Suzuki) ist es in der Tat gelungen, diese beiden Isomeren zu gewinnen. In der Regel aber wurde nur ein Produkt beobachtet. Man muß deshalb annehmen, daß unter den Bedingungen der Synthese eine Form die begünstigte ist und darum, wenn auch nicht ausschließlich, so doch in überwiegender Menge entsteht. Das läßt sich durch folgende Betrachtung erklären. Wenn inaktives Chlorid und inaktive Aminosäure in Lösung zusammentreffen, so spielt sich der Vorgang der Vereinigung zwischen den vier aktiven Molekülen d und l einerseits und d^{I}, l^{I} andererseits ab. Nach den jetzigen Erfahrungen über den Einfluß der Asymmetrie auf den Verlauf chemischer Verwandlungen, der am deutlichsten bei der Wirkung der Enzyme zutage tritt, ist es nun selbstverständlich, daß von den beiden Paaren $d\,d^{I}$, $l\,l^{I}$ und $d\,l^{I}$, $d\,l$ eines leichter und deshalb in größerer Menge als das andere entstehen kann.

Anders liegen die Verhältnisse, wenn für den Aufbau der Polypeptide aktive Komponenten, d. h. eine aktive Aminosäure oder ein aktives halogenhaltiges Säureradikal benutzt werden. Dann entstehen selbstverständlich optisch-aktive Polypeptide, und wenn eine der Komponenten racemisch ist, so hat man auch noch die Bildung von zwei Isomeren zu erwarten. Als Beispiel mag die Kombination von natürlichem, aktivem Tyrosin mit inaktiver α-Bromisocapronsäure dienen.

Die hierbei resultierende Verbindung

$$\mathrm{C_4H_9.CHBr.CO.NH.CH(CH_2.C_6H_4.OH).CO_2H}$$

muß nach der Theorie in den beiden sterischen Kombinationen $d\,l$ und $l\,l$ existieren. In Wirklichkeit macht nun allerdings das später beschriebene Präparat, obschon es in reichlicher Ausbeute entsteht, mehr den Eindruck einer einheitlichen Substanz.

Es ist jedoch möglich, daß die beiden Isomeren sich sehr ähnlich sind und deshalb Mischkristalle bilden, die man als halbracemische Kombinationen betrachten könnte.

In anderen Fällen wird man aber aller Wahrscheinlichkeit nach solchen isomeren Formen begegnen, die durch Kristallisation getrennt werden können.

Im nachfolgenden sind einige Polypeptide des Glykocolls, des inaktiven Alanins, Leucins und des aktiven *l*-Tyrosins beschrieben, die durch Kombination mit Chloressigsäure und inaktiver α-Bromisocapronsäure gewonnen wurden.

Außerdem sind im hiesigen Institut durch die Herren Leuchs, Suzuki, Koenigs, Warburg, Johnson, Axhausen, Brunner zahlreiche Kombinationen des Glykocolls, Alanins, Leucins, Phenylalanins, Cystins, Asparagins, der Asparaginsäure und Glutaminsäure mit Chloressig-, Brompropion- und Bromisocapronsäure studiert worden, über die später berichtet werden soll. Weitere Versuche betreffen die Anwendung der aktiven Halogensäuren, sowie der Diamino- und Oxyaminosäuren.

Manche der künstlichen Polypeptide werden ähnlich den natürlichen Proteïnen von Trypsin in die Aminosäuren gespalten. So zerfällt das Glycyl-*l*-tyrosin ziemlich rasch unter dem Einfluß des Enzyms in die Komponenten.

In anderen Fällen, z. B. bei dem racemischen Leucylleucin oder Leucylalanin verläuft die Spaltung asymmetrisch, ähnlich wie es früher bei den Derivaten des Glycyl-*d l*-leucins beobachtet wurde[1]).

Über diese Versuche werde ich später in Gemeinschaft mit Herrn P. Bergell berichten.

Nach allen bisher vorliegenden Beobachtungen besteht zwischen den künstlichen Polypeptiden und den natürlichen Peptonen eine unverkennbare Ähnlichkeit. Besonders gilt das für die synthetischen Produkte, die verschiedene Aminosäuren enthalten, und die ich in Zukunft als „gemischte Polypeptide" bezeichnen werde. Die gewöhnlichen Reaktionen der Peptone: Biuretfärbung, Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure, Hydrolyse durch Trypsin sind bei den komplizierteren Produkten vorhanden und treten noch schärfer zutage bei deren Amiden. Allerdings bestehen auch einige Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften; so sind manche künstliche Polypeptide in Wasser relativ schwer löslich, aber diese Differenz verliert an Bedeutung durch die Beobachtung, daß die Löslichkeit in kaltem Wasser bei den gemischten Formen und ganz besonders bei den optisch aktiven Kombinationen viel größer wird. Man darf ferner erwarten, daß mit der Einführung der Diamino- und Oxyaminosäuren in das Molekül die Löslichkeit in Wasser noch wachsen und die Neigung zur Kristallisation sich vermindern wird. Alles in allem neige ich zu der Ansicht, daß mit der Gewinnung der künstlichen Polypeptide der wichtigste Schritt zum Aufbau der Peptone getan ist.

---

[1]) E. Fischer u. P. Bergell, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2603. (*S. 582.*)

Dipeptide.

Die bisher bekannten Dipeptide Glycylglycin, Alanylalanin und Leucylleucin wurden durch Aufspaltung der Diacipiperazine gewonnen und enthalten zwei gleiche Aminosäuren. Für die Bereitung gemischter Formen ist das Verfahren aber wenig geeignet, da die Herstellung der gemischten Diacipiperazine aus den Aminosäuren bzw. Estern Schwierigkeiten bietet und auch die Aufspaltung sich öfters schwer regulieren läßt.

Das einzige, bisher bekannte, gemischte Diacipiperazin, das Glycin-Alaninanhydrid[1]),

$$\begin{array}{c} CO \\ NH \diagup \;\; \diagdown CH.CH_3 \\ H_2C \diagdown \;\; \diagup NH \\ CO \end{array}$$

, ist in der Tat auf dem Umweg über den Chloracetylalaninester gewonnen worden.

Ungleich bequemer für die Bereitung der gemischten Dipeptide ist deshalb das neue Verfahren.

Glycylalanin (inaktiv), $NH_2.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).CO_2H$.

Um das als Zwischenprodukt nötige Chloracetylalanin zu bereiten, kann man Chloracetylchlorid zusammenbringen entweder mit Alaninester oder mit einer alkalisch wässerigen Lösung von Alanin. Das zweite Verfahren ist das bequemere und soll zuerst beschrieben werden.

In eine durch Eis gekühlte Lösung von 30 g inaktivem Alanin in 340 ccm Normal-Natronlauge werden im Laufe von $^1/_4$ Stunde unter starkem Schütteln abwechselnd 170 ccm einer ätherischen Lösung, die 42 g Chloracetylchlorid (statt der ber. 38,1 g) enthält, und außerdem 510 ccm Normal-Natronlauge zugegeben. Die Temperatur des Gemisches soll nicht über 20° steigen. Sobald der Geruch nach Chloracetylchlorid verschwunden ist, wird die Flüssigkeit mit Salzsäure ganz schwach übersättigt, wozu 102 ccm $^5/_1$ *n*-Salzsäure ausreichen. Zur Isolierung des Chloracetylalanins muß jetzt die Flüssigkeit zur Trockne verdampft werden, und das ist, wenn man Zersetzung vermeiden will, unter stark vermindertem Druck auszuführen. Der Rückstand wird mit 200 ccm Aceton ausgekocht, das Filtrat möglichst stark verdunstet und die dabei eintretende Kristallisation zum Schluß durch Zusatz von 50 ccm Chloroform vervollständigt. Die Ausbeute an diesem kristallisierten Produkt betrug 49 g oder 88% der Theorie. Zur Reinigung wurde es in 80 ccm warmem Aceton gelöst und durch Zusatz von 160 ccm Chloroform und Abkühlung wieder ausgeschieden, wobei die Menge auf 42 g zurückging.

---

[1]) E. Fischer u. E. Otto, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2113. (*S. 321.*)

Die Substanz ist leicht löslich in Wasser, Aceton, Alkohol und Essigester, schwer in Chloroform. Sie reagiert und schmeckt stark sauer. Sie kristallisiert aus Aceton und Chloroform meist in mikroskopisch kleinen, vierseitigen, schiefen Tafeln. Der Schmelzpunkt ist nicht ganz konstant, er liegt bei 124—126° (korr. 125—127°). Für die Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1870 g Sbst.: 0,2478 g CO_2, 0,0836 g H_2O. — 0,1912 g Sbst.: 0,2556 g CO_2, 0,0854 g H_2O. — 0,2256 g Sbst.: 13,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_5H_8O_3NCl$. Ber. C 36,26, H 4,83, N 8,46.
Gef. „ 36,14, 36,46, „ 4,99, 5,01, „ 8,63.

Dieselbe Säure entsteht durch Verseifung ihres Esters, dessen Darstellung und Eigenschaften bereits beschrieben sind[1]). Man übergießt zu dem Zweck 1 g des Esters mit 5,7 ccm Normal-Natronlauge, schüttelt bei gewöhnlicher Temperatur kurze Zeit, bis Lösung eingetreten, fügt dann 5,7 ccm Normal-Salzsäure zu und isoliert das Chloracetylalanin in der zuvor geschilderten Weise. Die Verseifung erfolgt so glatt, daß die Ausbeute 93% der Theorie beträgt.

Für die Darstellung des Glycylalanins erhitzt man entweder 5 g Chloracetylalanin mit 25 ccm wässerigem Ammoniak $^3/_4$ Stunde auf 100°, oder man läßt 2 Tage lang bei gewöhnlicher Temperatur stehen.

Zur Isolierung werden dann Ammoniak und Wasser, zuletzt unter Zusatz von Alkohol, verdampft, der feste Rückstand durch Extraktion mit Alkohol von der Hauptmenge des Chlorammoniums befreit und zur weiteren Reinigung zweimal in je 5 ccm Wasser heiß gelöst und durch Zugabe von je 25 ccm heißem, absolutem Alkohol wieder abgeschieden. Die Substanz fällt zuerst ölig aus, erstarrt aber bald zu eisblumenartigen Kristallen. Die Ausbeute betrug in beiden Fällen nur 1,7 g oder 39% der Theorie. Für die Analyse wurde bei 100° getrocknet, wobei die Substanz nichts an Gewicht verlor.

0,1773 g Sbst.: 0,2684 g CO_2, 0,1096 g H_2O. — 0,1966 g Sbst.: 31,3 ccm N (15°, 772 mm).

$C_5H_{10}O_3N_2$. Ber. C 41,09, H 6,85, N 19,18.
Gef. „ 41,31, „ 6,87, „ 18,95.

Das Glycylalanin schmilzt bei raschem Erhitzen im Kapillarrohr gegen 223° (korr. 227°) unter lebhafter Gasentwickelung und färbt sich dann rot. In Wasser ist es sehr leicht, in Alkohol aber äußerst schwer löslich. Seine wässerige Lösung schmeckt und reagiert gegen Lakmus sehr schwach sauer. Sie löst Kupferoxyd beim Kochen sofort mit tiefblauer Farbe.

---

[1]) E. Fischer u. E. Otto, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2112. (*S. 321.*)

Zur weiteren Charakteristik des Dipeptids diente die Carbäthoxylverbindung. Für ihre Bereitung wurde 1 g Glycylalanin in 7 ccm Normal-Natronlauge gelöst, auf 0° abgekühlt und mit 1 g Chlorkohlensäureester anhaltend geschüttelt unter weiterem Zusatz von 0,4 g trocknem Natriumcarbonat, bis der Geruch des Chloresters verschwunden war. Auf Zusatz von 8 ccm Normal-Salzsäure schied sich dann das Carbäthoxylglycylalanin kristallinisch ab.

Die Ausbeute betrug 90% der Theorie. Nach dem Umlösen aus heißem Wasser zeigte die in langen Nadeln kristallisierte Substanz denselben Schmp. 187,5—188,5° (korr.) wie das früher auf anderem Wege[1]) dargestellte Präparat.

0,1960 g Sbst.: 17,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_8H_{14}N_2O_5$. Ber. N 12,85. Gef. N 12,72.

Leucyl-leucin (inaktiv).

Dieses Dipeptid entsteht, wie bekannt[2]), durch Aufspaltung des Leucinimids. Aber die Darstellung wird durch die verhältnismäßig geringe Ausbeute erschwert. Viel bequemer ist deshalb seine Synthese aus inaktivem Leucin und α-Bromisocapronsäure. Um das

α-Brom-isocapronyl-Leucin,

$$(CH_3)_2CH.CH_2.CHBr.CO.NH.CH\begin{cases}COOH\\CH_2.CH(CH_3)_2\end{cases},$$

zu bereiten, löst man 10 g synthetisches Leucin (aus Isovaleraldehyd) in 77 ccm Normal-Natronlauge, kühlt auf 0° ab und gibt dann unter tüchtigem Umschütteln abwechselnd 116 ccm Normal-Natronlauge (1,5 Mol.) und 18 g α-Bromisocapronylchlorid[3]) (1,1 Mol.) portionenweise hinzu.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2111 [1903]. (*S. 320.*)

[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1104 [1902]. (*S. 299.*)

[3]) Zur Gewinnung des Chlorids wurde nach der früheren Vorschrift (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2989 [1903]) die Bromisocapronsäure mit Phosphortrichlorid erwärmt. Nach neueren Beobachtungen geht die Reaktion besser bei Anwendung von Phosphorpentachlorid. Man gießt 10 Teile α-Bromisocapronsäure auf 13 Teile Phosphorpentachlorid (statt der ber. 10,7 Teile). Unter Erwärmung und starker Entwickelung von Salzsäure verschwindet das feste Pentachlorid größtenteils. Nachdem noch $^1/_4$ Stunde auf dem Wasserbade erhitzt ist, wird mit trocknem Äther aufgenommen, wenn nötig, von unverändertem Pentachlorid abfiltriert, auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand im Vakuum destilliert. Bei 12 mm Druck geht das Phosphoroxychlorid schon unter 25° fort und das Bromisocapronylchlorid destilliert bei 68—71°, während nur eine ganz geringe Menge brauner Substanz als Rückstand bleibt. Die Ausbeute ist beinahe quantitativ.

Das Schütteln wird fortgesetzt, bis der Geruch des Chlorids verschwunden ist, und dann die Flüssigkeit durch 23 ccm 5-fach Normal-Salzsäure angesäuert.

Das hierdurch in Freiheit gesetzte Bromcapronylleucin wird durch Äther leicht aufgenommen.

Beim Verdampfen des Äthers erfolgt ziemlich bald Kristallisation, die durch Zusatz von Petroläther vervollständigt wird. Die Ausbeute an kristallisiertem Produkt betrug 19,3 g oder 82% der Theorie.

Zur Reinigung wurden 10 Gewichtsteile des Präparates in 100 Volumteilen heißem Aceton gelöst und nach dem Abkühlen durch 200 Volumteile Petroläther wieder abgeschieden. Nach zweimaligem Umlösen schmolz die Substanz von 185—186° (korr. 188—189°) zu einer farblosen Flüssigkeit, die sich nach kurzer Zeit unter Färbung und Gasentwickelung zersetzte. Schon vor der Schmelzung war aber Sinterung zu beobachten. Für die Analyse wurden die Kristalle über Schwefelsäure getrocknet.

0,1478 g Sbst.: 0,2550 g CO_2, 0,0965 g H_2O. — 0,1901 g Sbst.: 7,8 ccm N (18°, 762 mm).

$C_{12}H_{22}O_3NBr$. Ber. C 46,75, H 7,14, N 4,55.
Gef. „ 47,05, „ 7,25, „ 4,75.

Die Substanz löst sich leicht in Alkohol und dann gradweise schwerer in Aceton, Äther, Chloroform, Benzol, Wasser und Ligroïn. Sie kristallisiert meist in mikroskopisch kleinen, schiefen, vierseitigen Tafeln. In Alkalien und Ammoniak ist sie leicht löslich.

Zur Umwandelung in Leucylleucin wurden 7 g des Bromisocapronylleucins in 35 ccm wässerigem Ammoniak, das bei gewöhnlicher Temperatur gesättigt war, gelöst und $^3/_4$ Stunden im Rohr auf 100° erhitzt. Beim Stehen der erkalteten Lösung begann die Abscheidung von langen, farblosen Kristallen, die wohl das Ammoniumsalz des Leucylleucins sind. Durch Verdampfen des Ammoniaks auf dem Wasserbade

---

Die von Kahlbaum bezogene Isocapronsäure mußte nach der Synthese die dem Leucin entsprechende Struktur haben. Um diesen Schluß zu prüfen, wurde die daraus bereitete Bromverbindung in die Aminosäure verwandelt.

Zu dem Zweck wurden 10 g der bromierten Säure in 50 ccm wässerigem Ammoniak, das bei gewöhnlicher Temperatur gesättigt war, 4 Stunden im Rohr auf 100° erhitzt. Schon beim Abkühlen schied sich ein Teil der Aminosäure in Blättchen aus. Der Rest wurde durch Abdampfen und Fällen mit Alkohol gewonnen. Die Ausbeute betrug 70% der Theorie. Das Präparat zeigte alle Eigenschaften des racemischen Leucins. Das gleiche gilt für die Phenylisocyanatverbindung, die gegen 165° (korr.) unter Gasentwickelung schmolz. Sie enthielt 11,28% Stickstoff, während 11,2% N für $C_{13}H_{18}N_2O_3$ berechnet sind.

und Abkühlung der Flüssigkeit wurde das freie Dipeptid erhalten. Die Ausbeute betrug 3,7 g oder 60% der Theorie.

Das Präparat zeigte ganz die Eigenschaften des Leucylleucins, welches früher aus Leucinimid gewonnen wurde; insbesondere enthielt es auch im lufttrockenen Zustande $1^1/_2$ Mol. Kristallwasser.

0,5501 g Sbst. verloren bei 100° 0,0558 g H_2O.

$C_{12}H_{24}O_3N_2 + 1^1/_2$ Mol. H_2O. Ber. H_2O 9,96. Gef. H_2O 10,14.

0,1811 g Sbst.: 0,3925 g CO_2, 0,1600 g H_2O.

$C_{12}H_{24}O_3N_2$. Ber. C 59,02, H 9,84.
Gef. „ 59,10, „ 9,81.

Die Darstellung des Leucylleucins kann auch bei gewöhnlicher Temperatur ausgeführt werden. Zu dem Zweck läßt man 1 g Bromkörper, in 5 ccm wässerigem Ammoniak von 25% gelöst, 4 Tage lang stehen. Nach dieser Zeit hat sich ein Teil des Ammoniumsalzes des Leucylleucins in langen, dünnen Prismen ausgeschieden. Die Isolierung ist dieselbe wie oben angegeben. Die Ausbeute ist etwas besser, nämlich 70% der Theorie.

Derivate des *l*-Tyrosins.

Das Tyrosin hat zwei leicht reagierende Gruppen: das Amid und das Hydroxyl im Benzolkern. Infolgedessen fixiert es in alkalischer Lösung leicht 2 Phenylcyanat- oder 2 Benzoylreste. Glücklicherweise läßt sich aber für die Synthese von Polypeptiden die Wirkung des Säurechlorids durch die richtige Wahl der Bedingungen so regulieren, daß der Eintritt des Säureradikals nur an der Aminogruppe erfolgt. Als Derivate des natürlichen Tyrosins sind die folgenden Verbindungen alle optisch-aktiv.

Chloracetyl-*l*-tyrosin. Es wird erhalten durch Einwirkung von Chloracetylchlorid entweder auf die alkalische Lösung von Tyrosin oder auf den Tyrosinester und nachträgliche Verseifung des hierbei entstehenden Chloracetyltyrosinesters.

Nach dem ersten Verfahren werden 9 g *l*-Tyrosin in 100 ccm Normal-Natronlauge (2 Mol.) gelöst, auf 0° abgekühlt und dann unter starkem Schütteln abwechselnd in kleinen Portionen 6,2 g Chloracetylchlorid (1,1 Mol.), das mit der 3-fachen Menge Äther verdünnt ist, und 50 ccm Normal-Natronlauge zugegeben.

Während der Reaktion fällt manchmal eine geringe Menge unverändertes Tyrosin aus. Man fügt zum Schluß soviel Salzsäure zu, daß alles Alkali dadurch gebunden wird, verdampft die Flüssigkeit im Vakuum zur Trockne und extrahiert den Rückstand mit heißem Aceton.

Beim Verdampfen dieser Lösung kristallisiert das Chloracetyl-*l*-tyrosin. Die Ausbeute beträgt allerdings nur 50% der Theorie. Die Ursache des großen Verlustes ist nicht aufgeklärt. Zur Reinigung wird das Produkt in etwa 6 Teilen heißem Wasser gelöst. Beim Abkühlen auf 0⁰ fällt der größte Teil, etwa $^4/_5$, in sehr kleinen Prismen wieder aus. Für die Analyse wurde über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

0,1783 g Sbst.: 0,3350 g CO_2, 0,0760 g H_2O.

$C_{11}H_{12}O_4NCl$. Ber. C 51,26, H 4,66.
Gef. „ 51,24, „ 4,74.

Die Verbindung schmilzt bei 153—154° (korr. 155—156°) ohne Zersetzung. Sie löst sich sehr leicht in Alkohol und Aceton, schwerer in Chloroform und Äther, fast gar nicht in Petroläther. Sie gibt in wässeriger Lösung die Millon'sche Reaktion.

Glatter verläuft die Synthese des entsprechenden Esters. Für seine Darstellung wird Tyrosinäthylester mit Chloracetylchlorid zusammengebracht. Da aber durch die Reaktion die Hälfte des Esters in Hydrochlorat verwandelt wird, das nicht mehr wirkt, so ist es ratsam, die Bedingungen so zu wählen, daß das Salz während der Operation wieder zerlegt wird. Dem entspricht folgende Vorschrift, bei der an Stelle des freien Esters das leichter zugängliche Hydrochlorat von vornherein zur Anwendung kommt.

10 g salzsaurer Tyrosinester werden mit 100 ccm Chloroform übergossen und nach dem Abkühlen auf 0° mit 41 ccm Normal-Natronlauge (1 Mol.) unter Schütteln versetzt. Der in Freiheit gesetzte Ester geht rasch in das Chloroform über. Ferner werden 5 g Chloracetylchlorid (statt der berechneten 4,6 g) mit 50 ccm Chloroform verdünnt und die Hälfte dieser Lösung zu obiger Mischung zugefügt. In der Chloroformlösung vollzieht sich dann die gewünschte Reaktion. Um den hierbei wiederum entstehenden salzsauren Tyrosinester noch nutzbar zu machen, werden jetzt zu der gekühlten Mischung unter Schütteln abwechselnd 20 ccm einer Natriumcarbonatlösung, die 4,7 g des trocknen Salzes enthält, und der Rest der obigen Chloroformlösung des Chloracetylchlorids zugegeben. Zum Schluß wird das Chloroform abgehoben, mit Natriumsulfat getrocknet, auf dem Wasserbade sehr stark eingedampft und endlich der Chloracetyl-*l*-tyrosinester durch Petroläther gefällt.

Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Sie schwankte bei verschiedenen Versuchen zwischen 93—95% der Theorie, berechnet auf den Tyrosinester. Zur Reinigung wird das Produkt nochmals in wenig Chloroform gelöst und durch Petroläther wieder abgeschieden. Für die Analyse war das Präparat wieder in dieser Weise umgelöst und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1678 g Sbst.: 0,3365 g CO_2, 0,0860 g H_2O. — 0,2653 g Sbst.: 12,0 ccm N (19°, 775 mm).

$C_{13}H_{16}O_4NCl$. Ber. C 54,64, H 5,60, N 4,90.
Gef. „ 54,69, „ 5,70, „ 5,31.

Die Verbindung bildet meist kleine Nadeln, die bei 86—87° (korr. 87—88°) schmelzen. Sie löst sich selbst in heißem Wasser schwer und kristallisiert daraus schnell beim Erkalten. Sie löst sich sehr leicht in Alkohol, Aceton, Chloroform, Essigester und heißem Benzol, schwerer in Äther, sehr schwer in Petroläther. Sie gibt ebenfalls Millons Reaktion. Zur Verseifung des Esters werden 10 g bei Zimmertemperatur in 70 ccm Normal-Natronlauge (2 Mol.) gelöst und nach 1/4 Stunde die äquivalente Menge Salzsäure zugefügt. Nach kurzer Zeit begann die Kristallisation des Chloracetyl-*l*-tyrosins, und nach mehrstündigem Stehen bei 0° betrug die Menge der Kristalle 6,85 g. Die Mutterlauge (85 ccm) wurde unter stark vermindertem Druck auf 20 ccm eingedampft und gab dann noch 1,35 g, so daß die Gesamtausbeute 8,2 g oder 91% der Theorie betrug.

Die Ausbeute, vom Tyrosin aus gerechnet, steigt also bei diesem Verfahren auf etwa 85% der Theorie, so daß es trotz des Umweges für die Darstellung des Chloracetyltyrosins der direkten Synthese vorzuziehen ist.

Glycyl-*l*-tyrosin, $NH_2.CH_2.CO.NH.CH\left<\begin{matrix}COOH\\CH_2.C_6H_4.OH\end{matrix}\right.$.

4 g Chloracetyl-*l*-tyrosin wurden mit 20 ccm wässerigem Ammoniak von 25% im geschlossenen Rohr 1 Stunde auf 100° erhitzt; dann dampfte man die Flüssigkeit auf dem Wasserbade stark ein, zuletzt unter Zusatz von Alkohol, um das Wasser möglichst zu entfernen.

Der sirupöse Rückstand wurde mit 100 ccm Alkohol in der Kälte digeriert. Dabei ging das Chlorammonium größtenteils in Lösung, und das Dipeptid verwandelte sich in eine pulverige, amorphe Masse, die nur noch wenig Chlor enthielt. Die Ausbeute an diesem Produkt, das hygroskopisch ist, betrug 2,1 g statt der berechneten 3,7 g. Zur Reinigung wurde es in 3 ccm Wasser gelöst, durch Kochen mit wenig Tierkohle entfärbt und aus dem kalten Filtrat durch 100 ccm absoluten Alkohol wieder gefällt. Die Menge betrug jetzt nur noch 0,95 g. Diese, nochmals in 1 ccm Wasser aufgenommen und mit Alkohol gefällt, gaben 0,5 g eines Präparates, das nach dem Trocknen über Schwefelsäure die Zusammensetzung des Glycyltyrosins zeigte.

0,1662 g Sbst.: 0,3363 g CO_2, 0,0927 g H_2O. — 0,1733 g Sbst.: 14,25 ccm 1/10 *n*-NH_3.

$C_{11}H_{14}N_2O_4$. Ber. C 55,46, H 5,88, N 11,76.
Gef. „ 55,18, „ 6,19, „ 11,51.

Das Produkt sinterte von 125° an und war unter Aufblähung bei 165° völlig geschmolzen. Es löst sich sehr leicht in Wasser und Methylalkohol, recht schwer in absolutem Alkohol und gar nicht in Äther. Es gibt die Millon'sche Reaktion. Durch Trypsin wird es bei 36° in 5-prozentiger wässeriger Lösung, die mit wenig Ammoniak versetzt ist, unter Abscheidung von Tyrosin gespalten. Leider gelang es bisher nicht, das Präparat zu kristallisieren. Um so erfreulicher ist es, daß das Hydrochlorat seines Äthylesters diese Eigenschaft besitzt.

Für seine Bereitung werden 1,5 g Glycyltyrosin mit 5 ccm starker alkoholischer Salzsäure übergossen, wobei Lösung eintritt und dann rasch aufkocht. Beim Abkühlen scheidet sich der größte Teil der neuen Verbindung als farblose Masse ab. Den Rest gewinnt man durch Verdunsten des Filtrats über Schwefelsäure und Kalk.

Die Ausbeute beträgt gegen 85% der Theorie. Das Salz ist sehr leicht löslich in Wasser, unlöslich in Äther und Essigester. Löst man es in etwa 10 Teilen heißem Alkohol, so scheidet es sich beim Erkalten daraus in mikroskopisch kleinen, wetzsteinartigen Kriställchen ab. Für die Analyse wurde über Schwefelsäure getrocknet. Das Salz schmilzt nicht konstant gegen 240° (korr. 245°) unter Gasentwickelung.

0,1914 g Sbst.: 15,3 ccm N (18°, 758 mm). — 0,1897 g Sbst.: 6,25 ccm $^1/_{10}$ n-Cl.

$C_{13}H_{18}O_4N_2.HCl$. Ber. Cl 11,74, N 9,26.
Gef. „ 11,70, „ 9,21.

α-Bromisocapronyl-l-tyrosin.

Ebenso wie die vorhergehende Chloracetylverbindung kann dieser Körper sowohl aus freiem Tyrosin wie aus Tyrosinester gewonnen werden.

Im ersteren Falle werden 3 g Tyrosin in 33,3 ccm n-Natronlauge (2 Mol.-Gew.) gelöst, dann nach dem Abkühlen in Eiswasser unter Schütteln abwechselnd in kleinen Portionen eine konzentrierte ätherische Lösung von 3,8 g α-Bromisocapronylchlorid und 16,5 ccm n-Natronlauge zugesetzt. Beim Ansäuern fiel ein Öl aus, das ausgeäthert und aus der stark konzentrierten, ätherischen Lösung durch Petroläther wieder gefällt wurde. Es erstarrte dann bald kristallinisch. Zur Reinigung wurde es mit 20 ccm Chloroform, worin es schwer löslich ist, ausgekocht. Die Ausbeute betrug 2,7 g oder 46% der Theorie. Für die Analyse wurde es zweimal in Normal-Natronlauge kalt gelöst, durch Säure wieder abgeschieden und schließlich über Schwefelsäure getrocknet.

0,1767 g Sbst.: 0,3239 g CO_2, 0,0900 g H_2O. — 0,2612 g Sbst.: 8,8 ccm N (19°, 766 mm).

$C_{15}H_{20}O_4NBr$. Ber. C 50,28 H 5,59, N 3,91.
Gef. „ 50,00, „ 5,66, „ 3,91.

Die Verbindung schmilzt bei 137—138° (korr. 139—140°), sie löst sich leicht in Alkohol, Aceton und Äther, sehr schwer in Chloroform und Petroläther. Aus Aceton wird sie durch Petroläther in mikroskopisch kleinen, meißelförmigen Prismen gefällt. Aus heißem Wasser, worin sie schwer löslich ist, scheidet sie sich beim Erkalten in kleinen, zu kugelförmigen Aggregaten verwachsenen Nadeln ab.

Um die Verbindung aus dem Tyrosinester darzustellen, werden 16,5 g (2 Mol.) in 100 ccm Chloroform gelöst und dazu 9 g (1 Mol.) α-Bromisocapronylchlorid in 50 ccm Chloroform zugefügt, wobei sofort salzsaurer Tyrosinester ausfällt. Beim Verdampfen des Chloroforms bleibt ein Öl, das bisher nicht kristallisiert erhalten wurde. Es wurde deshalb direkt zur Verseifung in 90 ccm Normal-Natronlauge bei Zimmertemperatur gelöst und nach viertelstündigem Stehen durch die äquivalente Menge Salzsäure das Bromisocapronyltyrosin gefällt. Es fiel als Öl aus, welches bald fest wurde, und die Ausbeute betrug 83% der Theorie, wobei allerdings zu beachten ist, daß die Hälfte des Tyrosinesters als Hydrochlorat der Reaktion entzogen wurde. Leider hat die Modifikation, die beim Chloracetyltyrosinester die Ausnutzung dieses salzsauren Tyrosinesters ermöglichte, hier versagt.

Wie in der Einleitung allgemeiner auseinandergesetzt ist, muß man annehmen, daß aus dem inaktiven α-Bromisocapronylchlorid und dem aktiven Tyrosin zwei stereoisomere Formen entstehen. Es ist deshalb wohl möglich, daß die vorstehende und die folgende Verbindung Gemische sind.

Leucyl-*l*-tyrosin.

Erhitzt man 4 g α-Bromcapronyltyrosin mit 20 ccm Ammoniak von 25% eine Stunde auf 100°, so ist das Brom völlig abgespalten. Die Lösung hinterläßt beim vollständigen Verdampfen zuletzt unter Zusatz von Alkohol einen halbfesten, amorphen Rückstand. Wird dieser mit 100 ccm kaltem Wasser aufgenommen, so bleibt eine kleine Menge eines kristallinischen Körpers zurück, von dem weiter unten die Rede sein wird. Die wässerige Lösung wird zur Entfernung des Broms mit Silbersulfat geschüttelt, aus dem Filtrat das Silber genau durch Salzsäure gefällt und nach abermaliger Filtration die Schwefelsäure durch Kochen mit Baryumcarbonat beseitigt. Die Lösung hinterließ jetzt beim Verdampfen auf dem Wasserbade eine amorphe Masse, die in Alkohol gelöst und durch Äther wieder gefällt wurde. Sie scheidet sich dabei in ähnlichem Zustand wie gefällte Eiweißkörper ab. Nachdem die Mutterlauge dekantiert und der Rest der Flüssigkeit im Exsikkator verdunstet ist, bildet sie eine leicht zerreibliche, aber ganz amorphe Masse, die schwach sauer reagiert, sich in Wasser äußerst leicht, in

Alkohol etwas schwerer löst, Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe aufnimmt und die Millon'sche Reaktion zeigt. Leider ist ihre Kristallisation bisher nicht gelungen. Infolgedessen hat auch die Analyse des bei 100⁰ getrockneten Präparates nur annähernde Werte gegeben.

0,1073 g vakuumtrockne Substanz verloren bei 100⁰ 0,0044 g H_2O oder 4,1%.

Substanz bei 100⁰ getrocknet:

0,1029 g Sbst.: 0,2257 g CO_2, 0,0679 g H_2O. — 0,1536 g Sbst.: 0,3367 g CO_2, 0,1021 g H_2O. — 0,1566 g Sbst.: 12,6 ccm N (17⁰, 768 mm).

		C		H		N
$C_{15}H_{22}O_4N_2$.	Ber.	61,23,		7,48,		9,53.
	Gef.	59,83,	59,79,	7,33,	7,39,	9,43.

Die Bildungsweise und auch die Eigenschaften der Substanz lassen aber kaum einen Zweifel darüber, daß sie die Hauptmenge nach Leucyltyrosin ist.

Leucin-tyrosin-anhydrid, $C_4H_9.CH\left\langle\begin{matrix}CO.NH\\NH.CO\end{matrix}\right\rangle CH.HC_2.C_6H_4.OH$.

Das obenerwähnte Nebenprodukt, dessen Menge nur 3,5% des angewandten Bromkörpers betrug, läßt sich aus 50-prozentiger Essigsäure gut umkristallisieren und bildet dann mikroskopisch kleine Nadeln, die gegen 310⁰ (korr.) unter Zersetzung schmelzen. Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, gab es Zahlen, die auf die Formel $C_{15}H_{22}O_4N_2$ passen.

0,1349 g Sbst.: 0,3034 g CO_2, 0,0898 g H_2O.

		C	H
$C_{15}H_{22}O_4N_2$.	Ber.	61,23,	7,5.
	Gef.	61,34,	7,4.

In viel größerer Ausbeute entsteht dieselbe Substanz bei der Einwirkung von Ammoniak auf α-Bromisocapronyl-*l*-tyrosinester.

Ihre nähere Untersuchung hat ergeben, daß in obiger Formel ein Molekül Kristallwasser enthalten ist, daß also die trockne Substanz die Zusammensetzung $C_{15}H_{20}O_3N_2$ hat.

Nach ihren Eigenschaften ist sie zu betrachten als ein Analogon des Leucinimids, d. h. als ein Piperazinderivat.

Dem entspricht der als Überschrift gewählte Name Leucintyrosinanhydrid und die daneben stehende Strukturformel.

Für die praktische Darstellung erhitzt man den obenerwähnten öligen Äthylester des α-Bromisocapronyl-*l*-tyrosins mit alkoholischem Ammoniak auf 100⁰. Für die Menge Ester, die aus 7 g salzsaurem Tyrosinester erhalten wird, kamen 30 ccm alkoholisches Ammoniak, das bei 0⁰ gesättigt war, zur Anwendung. Die Dauer des Erhitzens war 4 Stunden. Gegen Ende der Reaktion schieden sich aus der Flüssigkeit feine Nädelchen ab, deren Menge sich beim Abkühlen vergrößerte. Sie sind die

Ammoniumverbindung des Piperazinkörpers und werden schon beim Wegkochen des Ammoniaks gleichzeitig gelöst und zersetzt. Zur Isolierung des freien Piperazinkörpers wird die stark eingedampfte, alkoholische Lösung durch Wasser gefällt. Den Rest gewinnt man aus der Mutterlauge durch Wegkochen des Alkohols. Die Ausbeute betrug 3 g aus 7 g salzsaurem *l*-Tyrosinester. Das entspricht 70% der Theorie, da die Hälfte des Tyrosinesters bei der Kombination mit Bromcapronylchlorid der Reaktion ale Hydrochlorat entzogen wird.

Das Rohprodukt von Leucintyrosinanhydrid ist schon ziemlich rein. Für die Analyse wurde es aus 30 Teilen kochender 50-prozentiger Essigsäure umkristallisiert. Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz enthält 1 Molekül Kristallwasser, das bei 110° entweicht.

0,7553 g Sbst. verloren beim einstündigen Erhitzen auf 110° 0,047 g H_2O.

Ber. H_2O 6,13. Gef. H_2O 6,22.

Die trockne Substanz gab folgende Zahlen:

0,1919 g Sbst.: 0,4598 g CO_2, 0,1263 g H_2O. — 0,1819 g Sbst.: 15,9 ccm N (17°, 770 mm).

$C_{15}H_{20}O_3N_2$. Ber. C 65,22, H 7,25, N 10,14.
Gef. „ 65,35, „ 7,32, „ 10,28.

Das Leucintyrosinanhydrid schmilzt unter Zersetzung beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 310° (korr.).

Es ist in Wasser selbst in der Hitze schwer löslich und kristallisiert daraus beim Abkühlen in feinen Nädelchen. Auch in Äther ist es schwer löslich. Viel leichter wird es von heißem Alkohol und ganz besonders leicht von warmem Eisessig aufgenommen. Als Tyrosinderivat gibt es Millons Reaktion und löst sich leicht in Alkalien. Auch in überschüssigem Ammoniak ist es erheblich leichter löslich als in Wasser. Dagegen verhält es sich indifferent gegen verdünnte, wässerige Mineralsäuren.

Tripeptide.

Zur Darstellung des früher ausführlich beschriebenen Diglycylglycins[1]) sind noch folgende ergänzende Beobachtungen gemacht worden.

Das als Ausgangsmaterial dienende Chloracetylglycylglycin, welches früher auf dem Umweg über den Ester gewonnen wurde, kann vorteilhafter direkt aus dem salzsauren Glycylglycin in folgender Weise bereitet werden.

15 g des Hydrochlorats werden in 160 ccm Normal-Natronlauge gelöst, auf 0° abgekühlt und abwechselnd eine ätherische Lösung von 10 g

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2983 [1903]. (*S. 327.*)

Chloracetylchlorid und 160 ccm Normal-Natronlauge in kleinen Portionen unter Schütteln zugefügt. Zum Schluß gibt man noch die zur Bindung des Alkalis ausreichende Menge Salzsäure zu und verdampft unter 20 mm Druck auf 120 ccm. Die Menge des auskristallisierten Chloracetylglycylglycins betrug nach einigem Stehen bei 0° 8,6 g. Aus der Mutterlauge wurden durch Verdampfen unter geringem Druck und Auslaugen des trocknen Rückstandes mit 200 ccm heißem Alkohol, abermaliges Verdampfen und Umlösen aus wenig heißem Wasser noch 2,8 g gewonnen. Die Ausbeute betrug also 11,4 g oder 68% der Theorie.

Für die Umwandlung in Diglycylglycin ist es nicht nötig, mit Ammoniak auf 100° zu erhitzen; denn die Reaktion findet schon in der Kälte statt. Bei Anwendung von 5 g Chlorkörper und 25 ccm Ammoniak von 25% ist nach 15 Stunden das Halogen fast quantitativ abgespalten. Die Isolierung des Tripeptides geschieht in der früher angegebenen Weise. Die Ausbeute ist etwas besser. Sie betrug 62% der Theorie, während beim Erhitzen nur 50% erhalten wurden.

Endlich läßt sich die Umwandlung auch mit flüssigem Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur herbeiführen. Da die Ausbeute aber nicht besser ist (61% der Theorie), so hat das Verfahren keinen praktischen Wert.

Bei der Darstellung des Diglycylglycins mit wässerigem Ammoniak entsteht, zumal in der Wärme, als Nebenprodukt Glycinanhydrid. Es bleibt bei der Reinigung des Tripeptids in den wässerig-alkoholischen Mutterlaugen und kann daraus durch Eindampfen und Kristallisieren isoliert werden. Seine Menge betrug bei einer größeren Darstellung 3,4% des Chlorkörpers oder 6,8% des Tripeptids.

Zur Reinigung war es aus heißem Wasser umgelöst.

0,1746 g Sbst.: 0,2705 g CO_2, 0,0833 g H_2O. — 0,2503 g Sbst.: 44,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_4H_6O_2N_2$. Ber. C 42,11, H 5,26, N 24,56.
Gef. „ 42,25, „ 5,30, „ 24,61.

Es zeigte völlige Übereinstimmung mit dem Glycinanhydrid. Da aber ein Anhydrid des Triglycins ähnliche Eigenschaften haben konnte, so wurde das Präparat noch durch Kochen mit alkoholischer Salzsäure in salzsauren Glycylglycinester übergeführt, der ebenso wie ein Vergleichspräparat gegen 182° (korr.) unter Zersetzung schmolz.

Wie früher beschrieben, läßt sich das Diglycylglycin sehr leicht mit alkoholischer Salzsäure verestern und der Äthylester bildet ein schön kristallisierendes, in Alkohol schwer lösliches Hydrochlorat. Wird dieses in kalter, wässeriger Lösung mit Silberoxyd zerlegt, dann das Filtrat durch genauen Zusatz von Salzsäure vom Silber befreit, so hinterläßt die Flüssigkeit jetzt beim Eindunsten im Vakuum den Di-

glycylglycinester als kristallisierte, alkalisch reagierende, in Wasser leicht lösliche Masse. Ähnlich den Estern der einfachen Aminosäuren, ist diese Substanz zur Kondensation geneigt. Erhitzt man sie z. B. mehrere Stunden auf 110°, so wird ein erheblicher Teil in solche komplizierteren Produkte, die u. a. die Biuretreaktion geben, verwandelt, die man durch Behandeln mit viel alkoholischer Salzsäure von Diglycylglycin und seinem Ester trennen kann und über deren Zusammensetzung später ausführlich berichtet werden soll.

Tetrapeptide.

Ihre Synthese vollzieht sich genau in derselben Weise wie diejenige der vorher behandelten Substanzen.

Tri-glycyl-glycin,

$NH_2CH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

Zur Bereitung des Chloracetyldiglycylglycins kamen folgende Mengenverhältnisse zur Anwendung:

12 g Diglycylglycin, gelöst in 63 ccm Normal-Natronlauge, eine ätherische Lösung von 8,25 g Chloracetylchlorid und weitere 126 ccm Normal-Natronlauge. Die Operation war die gleiche wie in den analogen Fällen. Beim Ansäuern der Lösung schied sich der größte Teil des neuen Chlorkörpers kristallinisch ab. Der Rest wurde aus der Mutterlauge durch Einengen unter geringerem Druck gewonnen. Die Ausbeute betrug 14,45 g oder 86% der Theorie. Das Rohprodukt ist nahezu rein. Für die Analyse wurden 1,5 g aus 20 ccm heißem Wasser umkristallisiert und die in der Kälte ausgefallenen 1,1 g über Schwefelsäure getrocknet.

0,1627 g Sbst.: 0,2177 g CO_2, 0,0675 g H_2O. — 0,1399 g Sbst.: 16,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_8H_{12}O_5N_3Cl$. Ber. C 36,16, H 4,52, N 15,82.
Gef. „ 36,48, „ 4,65, „ 16,11.

Im Kapillarrohr erhitzt, bräunt sich die Substanz und schmilzt unter Zersetzung gegen 220° (korr. 224°); sie kristallisiert aus Wasser meist in kleinen, vierseitigen, schiefen Tafeln; sie löst sich in Alkohol in der Kälte schwer, in der Wärme leichter. Die Löslichkeit nimmt dann gradweise ab für Aceton, Chloroform, Essigester, Äther.

Zur Umwandlung in das Tetrapeptid wurde die Chlorverbindung mit der 5-fachen Menge wässerigem Ammoniak von 25% 1 Stunde auf 100° erhitzt, dann die Lösung stark eingedampft und mit viel Alkohol versetzt. Dabei fiel das Tetrapeptid aus, während Chlorammonium in Lösung blieb. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt in der 8-fachen

Menge Wasser gelöst, mit etwas Tierkohle gekocht und das Filtrat durch Alkohol wieder gefällt. Die Menge des so erhaltenen chlorfreien und schon recht reinen Präparates betrug 66% der Theorie. Für die Analyse wurde es noch zweimal aus Wasser durch Alkohol gefällt und dann bei 100⁰ getrocknet, da es bei gewöhnlicher Temperatur auch im Vakuum eine wechselnde Menge Wasser (2—5%) zurückhält.

0,1558 g Sbst.: 0,2243 g CO_2, 0,0800 g H_2O. — 0,1605 g Sbst.: 25,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_8H_{14}O_5N_4$. Ber. C 39,03, H 5,69, N 22,77.
Gef. „ 39,26, „ 5,74, „ 22,42.

Das Triglycylglycin hat keinen Schmelzpunkt. Es beginnt von 220⁰ an sich zu färben und ist gegen 270⁰ ganz dunkel, bei stärkerem Erhitzen entwickelt es viel Ammoniak. In alkalischer Lösung gibt es mit Kupfersalzen eine ziemlich starke Biuretfärbung und auch die wässerige Lösung nimmt beim Erwärmen Kupferoxyd mit blauvioletter Farbe auf. Die wässerige Lösung reagiert gegen Lakmus sehr schwach sauer und ist so gut wie geschmacklos. In Wasser ist es schwerer löslich als die einfacheren Polypeptide des Glycins; es verlangt von heißem Wasser ungefähr 4 Teile. Obschon es in der Kälte sehr viel schwerer löslich ist, so scheidet es sich doch aus der warmen Flüssigkeit nur sehr langsam ab. Sofort erfolgt die Fällung auf Zusatz von Alkohol; so gewonnen, bildet das Tetrapeptid ein farbloses Pulver, das zweifellos eine kristallinische Struktur hat, in dem man aber selbst unter dem Mikroskop keine besonders charakteristischen Formen findet.

Als Nebenprodukt entsteht bei der Darstellung dieses Peptids auch eine kleine Menge Glycinanhydrid, das in den wässerig-alkoholischen Mutterlaugen bleibt. Isoliert wurden aber nur 2% vom Gewicht des angewandten Chlorkörpers.

0,1675 g Sbst.: 0,2597 g CO_2, 0,0810 g H_2O.

$C_4H_6N_2O_2$. Gef. C 42,11, H 5,26.
Gef. „ 42,28, „ 5,37.

Die Aufspaltung mit alkoholischer Salzsäure gab auch hier salzsauren Glycylglycinester.

Derivate dieses Tetrapeptids sind bereits bekannt. Die Benzoylverbindung wurde von Curtius aus dem Azid des Hippurylglycins[1])

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3226 [1902]. Vor kurzem hat Herr Th. Curtius mir den Vorwurf gemacht, daß ich seine älteren Versuche über die Verkettung von Aminosäuren nicht berücksichtigt habe, und er knüpft diese Bemerkung an die Erwähnung des Hippurylglycins (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1285 [1904]). Ich habe meinen Augen nicht getraut, als ich diese Äußerung des Herrn Curtius las, denn sein Name ist gerade in der von ihm beanstandeten Abhandlung von Fourneau und mir (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2868 [1901])

und Glycylglycin aufgebaut, und der Äthylester ist, wie ebenfalls Curtius[1]) vor kurzem gezeigt hat, die sogenannte Biuretbase, die er vor 20 Jahren allerdings nur in unreinem Zustand bei der freiwilligen Zersetzung des Glycinesters erhalten hatte. Immerhin schien ein direkter Vergleich der auf verschiedenen Wegen gewonnenen Produkte wünschenswert, da nach den Erfahrungen mit den Carbäthoxylderivaten[2]) eigenartige Isomerien in der Klasse der Polypeptide nicht ausgeschlossen sind. Es wurden deshalb Äthylester und Benzoylverbindung des Triglycylglycins dargestellt.

---

auf Seite 2 dreimal genannt. Er wird angeführt als der Entdecker des Hippurylglycins, ferner des Glycinanhydrids und endlich der sogenannten Biuretbase, die aus Glycinester entsteht. Ausführlicher ist diese Biuretbase nebst dem Glycinester und Glycinanhydrid als Entdeckungen des Herrn Curtius von mir in einer kurz vorher publizierten Abhandlung (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 433 [1901]) besprochen. Das waren meines Erachtens alle Beobachtungen des Herrn Curtius, die mit meinen Versuchen und dem von mir verfolgten Problem der Synthese von Anhydriden der Aminosäuren in direkter Beziehung standen.

Allerdings habe ich nicht erwähnt die beiden von Curtius beschriebenen komplizierten Benzoylkörper, die er bei Einwirkung von Benzoylchlorid auf Glykocollsilber (Journ. für prakt. Chem. [2] **26**, 197) oder auch beim Erhitzen von Hippursäureester mit Glykocoll (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **16**, 756 [1883]) erhielt, und von denen nach der neuesten Publikation von Curtius (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1279 [1904]) nur eine mit einer veränderten Formel übrig geblieben ist. Aber ich habe das mit guter Absicht unterlassen, erstens weil die Angaben des Herrn Curtius kein Urteil über die wirkliche Zusammensetzung dieser Produkte oder der auf ähnliche Art entstehenden Acetylkörper (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **17**, 1666 [1884]) gestatteten und auch in einem Zeitraum von 18 Jahren keine Vervollständigung erfuhren, ferner und hauptsächlich, weil diese komplizierten Benzoylverbindungen doch nur ein sehr untergeordnetes Interesse für die Kenntnis der benzoylfreien Verbindungen haben. Für das Studium der natürlichen Proteïne kommen aber nur die Anhydride der Aminosäuren selbst in Betracht, und in der Abhandlung von Fourneau und mir ist ausdrücklich angegeben, daß unsere Versuche auf die künstliche Synthese solcher Stoffe gerichtet seien.

Der Vorwurf des Herrn Curtius, daß in unserer kurzen historischen Einleitung seine Arbeiten nicht berücksichtigt seien, ist deshalb durchaus ungerechtfertigt. Ich habe mich darüber um so mehr wundern müssen, als Herr Curtius selbst die Gewohnheit hat, meine Versuche zu ignorieren. Als er nach 19-jähriger Unterbrechung seine Versuche über die Benzoylderivate der Anhydride des Glykocolls wieder aufnahm (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3226 [1902]), hielt er es für überflüssig, die von mir inzwischen publizierten Untersuchungen auf dem gleichen Gebiete zu erwähnen. Ich habe deshalb Veranlassung genommen, in einer Fußnote (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2905 [1903]) auf diese Unterlassung aufmerksam zu machen. Seine einzige Antwort darauf war die oben von mir kritisierte Gegenklage.

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1284 ff. [1904].

[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem Gesellsch. **36**, 2096 [1903]. (*S. 304.*)

Salzsaurer Triglycyl-glycin-äthylester.

Erwärmt man 4 g Tetrapeptid mit 100 ccm heiß gesättigter alkoholischer Salzsäure gelinde, so geht es in Lösung und sobald man aufkocht, beginnt die Kristallisation des salzsauren Esters. Nach dem Erkalten wurde er abfiltriert und mit Alkohol und Äther gewaschen. Seine Menge betrug 4 g.

Für die Analyse wurde 1 g des Salzes in 200 ccm heißem absolutem Alkohol gelöst und nach Zusatz von wenig alkoholischer Salzsäure durch Abkühlen wieder abgeschieden. Das Präparat gab nach dem Trocknen über Schwefelsäure folgende Zahlen:

0,1966 g Sbst.: 0,2778 g CO_2, 0,1059 g H_2O. — 0,1840 g Sbst.: 0,2586 g CO_2, 0,1023 g H_2O. — 0,1664 g Sbst.: 25,2 ccm N (17°, 762 mm). — 0,1890 g Sbst.: 0,0852 g AgCl.

$C_{10}H_{19}O_5N_4Cl$.	Ber. C 38,63,	H 6,16,	N 18,06,	Cl 11,41.
	Gef. „ 38,33, 38,54,	„ 6,23, 6,04,	„ 17,63,	„ 11,15.

Die feinen Kristallblättchen schmolzen unter schwacher Gasentwickelung und Färbung bei 208—210° (korr. 212—214°). Curtius hat allerdings einen niedrigeren Schmelzpunkt angegeben (192—193°). Aber auf diese Differenz ist wohl nicht viel zu geben, da der Schmelzpunkt bei solchen Salzen durch kleine Verunreinigungen sehr stark herabgedrückt wird. Allerdings genügt auch der Versuch nicht zur Identifizierung.

Besser war das Resultat bei der Benzoylverbindung. Zu ihrer Bereitung wurde 1 g Triglycylglycin mit 2,6 g Natriumbicarbonat in 40 ccm Wasser gelöst und dazu tropfenweise 1,7 g Benzoylchlorid unter Schütteln zugegeben, dann die Lösung angesäuert und der Niederschlag nach dem Absaugen, Waschen und Trocknen durch Auslaugen mit 50 ccm Äther von der Benzoësäure befreit. Die Ausbeute an unlöslicher Benzoylverbindung, die schon fast rein war, betrug 1 g oder 70% der Theorie. Für die Analyse wurde das Präparat aus der 40-fachen Menge Wasser umgelöst und bei 100° getrocknet.

0,1703 g Sbst.: 0,3207 g CO_2, 0,0805 g H_2O.

$C_{15}H_{18}O_6N_4$.	Ber. C 51,43,	H 5,14.
	Gef. „ 51,36,	„ 5,25.

Die Verbindung zeigte den Schmp. 235°, den Curtius für die auf anderem Wege[1]) gewonnene Substanz angibt. Ferner wurde für den Ester, der aus der Säure durch Erwärmen mit alkoholischer Salzsäure entsteht, der angegebene Schmp. 213° (korr. 217°) unter Braunfärbung gefunden.

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3227 [1902].

α-Bromisocapronyl-leucyl-glycyl-glycin,

$C_4H_9.CHBr.CO.NH.CH(C_4H_9).CO.NHCH_2.CO.NHCH_2.CO_2H$.

Zu einer Lösung von 4 g Leucylglycylglycin[1]) in 16,4 ccm Normal-Natronlauge (1 Mol.) fügte man abwechselnd und portionsweise eine konzentrierte ätherische Lösung von 3,8 g α-Bromisocapronylchlorid (etwas mehr als 1 Mol.) und 24,6 ccm Normal-Natronlauge. Nachdem das unverbrauchte Säurechlorid durch Ausäthern entfernt war, wurde mit Salzsäure übersättigt und die ölig ausgeschiedene Bromisocapronylverbindung ausgeäthert. Beim völligen Verdampfen des Äthers blieb eine feste, gummiartige Masse, die beim Verreiben mit Petroläther weiß und pulverig wurde. Ihre Menge betrug 5,4 g oder 78% der Theorie. Sie löst sich in wenig heißem Essigester und kristallisiert daraus beim Abkühlen. Für die Analyse wurde sie in der 6-fachen Volummenge Essigester gelöst und dazu das 12-fache Volumen Äther gefügt. Die anfangs klare Lösung schied beim längeren Stehen $^2/_3$ der aufgelösten Menge in äußerst kleinen flimmernden Kristallen ab, welche für die Analyse im Vakuum getrocknet wurden.

0,1798 g Sbst.: 16,0 ccm N (19°, 764 mm). — 0,1533 g Sbst.: 0,0674 g AgBr.

$C_{16}H_{28}O_5N_3Br$. Ber. Br 18,95, N 9,95.

Gef. „ 18,71, „ 10,29.

Die Substanz sinterte von 152° ab und schmolz bei 158—159° (korr. 161—162°). Sie ist in Wasser selbst in der Hitze recht schwer löslich und fällt daraus beim Abkühlen zuerst als Öl aus, erstarrt aber später kristallinisch. Sie ist leicht löslich in Alkohol, Aceton und heißem Essigester, schwer löslich in Chloroform und Äther. Trotzdem kann sie leicht ausgeäthert werden, wie in obiger Vorschrift angegeben ist, solange sie unrein und ölig ist.

Dileucyl-glycyl-glycin (inaktiv),

$NH_2.CH(C_4H_9).CO.NH.CH(C_4H_9).CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

Werden 4,2 g der vorigen Bromverbindung mit 20 ccm Ammoniak (spez. Gewicht 0,91) 1 Stunde auf 100° erhitzt und dann die Lösung auf dem Wasserbade möglichst vollständig, zuletzt unter Zusatz von Alkohol, verdampft, so bleibt ein halbfester Rückstand. Beim Anrühren mit 30 ccm absolutem Alkohol geht das Bromammonium ganz in Lösung und der Rückstand verwandelt sich nach kurzer Zeit in eine pulverige Masse. Er ist schon ziemlich reines Tetrapeptid. Seine Menge betrug 1,4 g oder 39% der Theorie. Beim längeren Stehen schied die

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2990 [1903]. (*S. 333.*)

alkoholische Mutterlauge noch 0,4 g ab, so daß die Gesamtausbeute 51% der Theorie betrug.

Das Tetrapeptid ist in den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln, ausgenommen Eisessig, fast gar nicht löslich; auch in Wasser selbst in der Hitze löst es sich im Vergleich zu den anderen Polypeptiden ziemlich schwer, wahrscheinlich weil es von Wasser so schwer benetzt wird. Andererseits aber kommt es aus der heißen, wässerigen Lösung beim Abkühlen nicht mehr heraus, auch nicht auf Zusatz von Alkohol. Für die Analyse wurde deshalb 1 g des Präparates in 24 ccm verdünntem Alkohol von 50% warm gelöst und nach dem Abkühlen 60 ccm Äther zugefügt. Es kristallisierte so in mikroskopisch kleinen Nadeln, die meist büschelförmig verwachsen waren.

Nach mehrstündigem Stehen waren 0,6 g als kristallinisches Pulver abgeschieden, die für die Analyse über Schwefelsäure getrocknet wurden.

0,1686 g Sbst.: 0,3295 g CO_2, 0,1281 g H_2O. — 0,1717 g Sbst.: 22,8 ccm N (17°, 764 mm).

$C_{16}H_{30}O_5N_4$. Ber. C 53,63, H 8,38, N 15,64.
Gef. „ 53,32, „ 8,44, „ 15,43.

Das Tetrapeptid schmolz nicht scharf gegen 250° unter Zersetzung; seine alkalische Lösung gibt mit Kupfersalzen eine starke Biuretfärbung. Seine wässerige Lösung schmeckt bitter und reagiert gegen Lakmus sehr schwach sauer. Es wird von Phosphorwolframsäure auch aus stark verdünnter Lösung gefällt. Der Niederschlag löst sich aber im Überschuß der Phosphorwolframsäure, sowie beim Erhitzen.

Pentapeptide.

Das einzige bisher gewonnene Glied dieser Gruppe ist das Derivat des Glykocolls. Als Ausgangsmaterial dient das

Chloracetyl-triglycyl-glycin,
$ClCH_2.CO.[NH.CH_2.CO]_3.NH.CH_2.COOH$.

Seine Bereitung aus Triglycylglycin und Chloracetylchlorid wurde genau so wie in den analogen Fällen ausgeführt. Es scheidet sich beim Ansäuern der alkoholischen Lösung als feste, voluminöse Masse aus. Die Ausbeute betrug ebensoviel wie das angewandte Tripeptid oder 76% der Theorie.

Zur Reinigung wurde es aus der 15-fachen Menge heißem Wasser umgelöst, wobei etwa $^1/_5$ in Lösung blieb. Für die Analyse wurde über Schwefelsäure getrocknet.

0,1910 g Sbst.: 0,2605 g CO_2, 0,0811 g H_2O. — 0,1888 g Sbst.: 23,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_{10}H_{15}O_6N_4Cl$. Ber. C 37,21, H 4,65, N 17,36.
Gef. „ 37,20, „ 4,72, „ 17,57.

Im Kapillarrohr färbt sich die Verbindung von 230° an gelb und schmilzt unter Gasentwickelung gegen 250° (korr. 256°). In den meisten Lösungsmitteln ist sie sehr schwer löslich. Von kochendem Wasser verlangt sie etwa die 10-fache Menge und scheidet sich daraus beim Erkalten als mikrokristallinisches, farbloses Pulver ab. Sie schmeckt und reagiert sauer. Mit Alkali und Kupfersalzen gibt sie eine blauviolette Färbung.

Tetraglycyl-glycin,

$NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO.$
$NH.CH_2.CO_2H$.

2 g des vorigen Chlorkörpers wurden mit 10 ccm Ammoniak (spez. Gewicht 0,91) 1 Stunde auf 100° erhitzt, dann die Lösung größtenteils verdampft und das Pentapeptid durch Zusatz von Alkohol gefällt.

Seine Menge betrug 1,27 g oder 65% der Theorie. Zur Reinigung wurde das Präparat in der 50-fachen Menge heißem Wasser gelöst und mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt, wobei nur $^1/_5$ in der Mutterlauge blieb. Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, enthielt die Substanz noch etwas Wasser (4%). Sie wurde deshalb für die Analyse bei 100° getrocknet.

0,1691 g Sbst.: 0,2460 g CO_2, 0,0862 g H_2O. — 0,1972 g Sbst.: 32,35 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_{10}H_{17}N_5O_6$. Ber. C 39,93, H 5,61, N 23,10.
Gef. „ 39,68, „ 5,67, „ 22,97.

Das Pentapeptid wurde bisher nur als farbloses, lockeres Pulver erhalten, das unter dem Mikroskop körnig, aber ohne deutliche Kristallstruktur erscheint. Im Kapillarrohr bräunt es sich gegen 240° (korr. 246°) und zersetzt sich bei höherer Temperatur, ohne zu schmelzen. Mit Alkali und Kupfersalzen gibt es starke Biuretfärbung. Es gleicht dem Triglycylglycin, unterscheidet sich aber von diesem durch geringere Löslichkeit in Wasser. In Alkohol, Äther usw. ist es so gut wie unlöslich. In Alkali und Mineralsäuren ist es leicht löslich.

Da die natürlichen Proteïne in der Regel neben den Monoaminosäuren auch Diamino- und Oxyaminosäuren enthalten, so erwächst der Synthese selbstverständlich die Aufgabe, diese gleichfalls zum Aufbau der Polypeptide zu verwenden. Man kann für diesen Zweck einer-

seits von den Diaminosäuren und Oxyaminosäuren ausgehen und es sind im hiesigen Institut bereits Versuche in Angriff genommen, das Lysin und Serin mit Brompropionylchlorid und Bromcapronylchlorid zu verbinden. Andererseits kann man die Monoaminosäuren kombinieren mit den Chloriden der Dihalogensäuren und darf dann hoffen, die beiden Halogene durch Amid oder Amid und Hydroxyl ersetzen zu können.

Die erste Phase dieser Reaktion ließ sich bei dem Dibrompropionylchlorid[1]) verwirklichen, bezüglich der zweiten sind aber die Versuche noch nicht abgeschlossen.

α,β-Dibrompropionyl-glycin, $CH_2Br.CHBr.CO.NH.CH_2.COOH$.

Wird 1 g Glykocoll in 13 ccm Normal-Natronlauge gelöst und dazu bei 0° unter Schütteln abwechselnd eine ätherische Lösung von 3,3 g Dibrompropionylchlorid und 13 ccm Normal-Natronlauge zugefügt, so geht, abgesehen von dem Auftreten eines stechenden Geruchs, die Reaktion ohne sichtbare Erscheinungen vonstatten.

Zum Schluß wird mit Salzsäure übersättigt und ausgeäthert. Aus der stark eingeengten ätherischen Lösung fällt auf Zusatz von Petroläther zuerst das Dibrompropionylglycin als farblose, kristallinische Masse aus. Später kann auch Dibrompropionsäure ausfallen. Die Ausbeute war allerdings wenig befriedigend. Sie betrug nur 0,5 g oder 13% der Theorie, wird sich aber hoffentlich noch durch Änderung der Bedingungen verbessern lassen. Für die Analyse wurde das Präparat in Äther gelöst, durch Petroläther ausgefällt und über Schwefelsäure getrocknet.

0,3280 g Sbst.: 22,75 ccm $^1/_{10}n$-Br. — 0,1789 g Sbst.: 7,4 ccm N (19°, 764 mm).

$C_5H_7O_3NBr_2$. Ber. Br 55,36, N 4,85.
Gef. „ 55,49, „ 4,78.

Die Verbindung schmilzt bei 145—146° (korr. 147—148°) und zersetzt sich gegen 170° unter Gasentwickelung und Braunfärbung. Sie

[1]) Das schon von Moureu (Ann. chim. phys. [7], 2, 165) aus Acrylsäurechlorid und Brom gewonnene α,β-Dibrompropionylchlorid läßt sich bequemer aus der α,β-Dibrompropionsäure mit Phosphorpentachlorid bereiten. Zu dem Zweck wird die Säure mit dem gleichen Gewicht Phosphorpentachlorid zusammengebracht, wobei bald Schmelzung und starke Salzsäureentwickelung eintritt. Nachdem noch 1/4 Stunde auf dem Wasserbade erhitzt ist, wird die bräunliche Flüssigkeit mit wenig absolutem Äther vermischt, vom unverbrauchten Pentachlorid abfiltriert und unter stark vermindertem Druck fraktioniert. Äther und Phosphoroxychlorid destillieren bei niederer Temperatur, und das Dibrompropionylchlorid geht unter 12 mm Druck bei 71—73° über. Die Ausbeute betrug 85% der Theorie.

löst sich leicht in Wasser, Alkohol und Aceton, schwerer in Benzol und Chloroform und noch schwerer in Äther, wenn sie rein und kristallisiert ist. In Petroläther ist sie so gut wie unlöslich. Aus den meisten Lösungsmitteln kristallisiert sie in Nadeln oder dünnen Prismen. Durch Alkali, Alkalicarbonat und Ammoniak wird sie schon in kalter wässeriger Lösung unter Abspaltung von Bromwasserstoff angegriffen. Ebenso erfolgt beim Kochen mit Silbernitratlösung Abscheidung von Bromsilber.

α,β-Dibrompropionyl-glycyl-glycin, $CH_2Br.CHBr.CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO_2H$.

5 g salzsaures Glycylglycin werden in 53,6 ccm Normal-Natronlauge (2 Mol.) gelöst, dann in einer Kältemischung stark gekühlt und unter Schütteln abwechselnd 7 g Dibrompropionylchlorid und 40 ccm Normal-Natronlauge zugegeben. Wird die angesäuerte Flüssigkeit jetzt ausgeäthert, so gehen die regenerierte Dibrompropionsäure und andere Zersetzungsprodukte in den Äther, während das Glycylglycinderivat in der wässerigen Flüssigkeit bleibt und sich daraus beim Stehen in Eis kristallinisch abscheidet. Durch Einengen der Mutterlauge unter stark vermindertem Druck wurde noch eine zweite, aber ziemlich geringe Kristallisation erhalten. Die Ausbeute betrug 5,1 g oder 55% der Theorie.

Das Produkt wurde aus der 10-fachen Menge heißem Wasser umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet.

0,2061 g Sbst.: 0,2255 g AgBr. — 0,1754 g Sbst.: 12,1 ccm N (16°, 766 mm).

$C_7H_{10}O_4N_2Br_2$. Ber. N 8,09, Br 46,24.
Gef. „ 8,11, „ 46,45.

Das Dibrompropionylglycylglycin schmilzt unter Zersetzung beim raschen Erhitzen gegen 180° (korr. 184°); es kristallisiert aus Wasser, worin es in der Kälte schwer löslich ist, in mikroskopisch kleinen, schief abgeschnittenen Prismen. In Äther, Petroläther, Benzol, Chloroform ist es so gut wie unlöslich; ziemlich schwer löst es sich in warmem Aceton und kaltem Alkohol, ziemlich leicht in warmem Alkohol.

Durch wässeriges Ammoniak wird bald alles Brom abgespalten. Ebenso leicht als die Säure läßt sich ihr Ester nach folgendem Verfahren bereiten:

α,β-Dibrompropionyl-glycyl-glycinester.

6,2 g Glycylglycinester werden in 30 ccm Chloroform gelöst und dazu eine ätherische Lösung von 4,8 g Dibrompropionylchlorid in Äther gegeben. Unter Erwärmen fällt ein Öl aus, das bald erstarrt und ein

Gemisch von salzsaurem Glycylglycinester mit der neuen Verbindung ist. Letztere bleibt aber auch in erheblicher Menge in der Mutterlauge. Wird diese verdampft und mit etwa 20 ccm Äther aufgenommen, so bleibt der darin schwer lösliche Dibrompropionylglycylglycinester zurück. Den Rest gewinnt man aus dem ersten Niederschlage durch Auslaugen mit 100 ccm Essigester, Verdunstung des Filtrats und Übergießen des Rückstandes mit Äther. Die Gesamtausbeute an Rohprodukt betrug 4,8 g oder 66% der Theorie, da die Hälfte des angewandten Glycylglycinesters der Reaktion als Hydrochlorat entzogen wird.

Zur Reinigung wurde der Ester aus der 20-fachen Menge heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle umgelöst. Für die Analyse wurde über Schwefelsäure getrocknet.

0,2012 g Sbst.: 0,2017 g AgBr. — 0,1936 g Sbst.: 12,4 ccm N (20°, 762 mm).

$C_9H_{14}O_4N_2Br_2$. Ber. Br 42,78, N 7,49.
Gef. „ 42,66, „ 7,35.

Die Verbindung kristallisiert meist in kleinen Prismen; im Kapillarrohr sintert sie gegen 145° und schmilzt bei 149—150° (korr. 151—152°); sie ist leicht löslich in Alkohol, Chloroform und heißem Essigester, schwerer löslich in Benzol und Äther, fast unlöslich in Petroläther.

Bei der Behandlung mit kaltem Alkali wird der Ester nicht allein verseift, sondern verliert auch Bromwasserstoff, und es entsteht eine Säure von der Formel $C_7H_9O_4N_2Br$, die man wohl als die Kombination von Glycylglycin und Bromacrylsäure betrachten kann, und die dementsprechend bezeichnet werden darf als

Bromacrylyl-glycyl-glycin,
$C_2H_2BrCO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

10 g Dibrompropionylglycylglycinester werden mit 60 ccm Normal-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt, bis Lösung eingetreten ist, dann die Flüssigkeit mit 6 ccm $^5/_1$ *n*-Salzsäure versetzt. Es bildet sich sofort ein kristallinischer Niederschlag, der nach einigem Stehen der auf 0° abgekühlten Lösung filtriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen wird. Die Ausbeute betrug 85% der Theorie. Die Verarbeitung der Mutterlauge lohnt sich nicht.

Zur Reinigung wird die Säure aus der 10-fachen Menge kochendem Wasser umgelöst. Für die Analyse wurde im Vakuum getrocknet.

0,1853 g Sbst.: 0,2178 g CO_2, 0,0591 g H_2O. — 0,1917 g Sbst.: 17,6 ccm N (18°, 746 mm). — 0,1416 g Sbst.: 12,8 ccm N (18°, 764 mm). — 0,1969 g Sbst.: 0,1389 g AgBr.

$C_7H_9O_4N_2Br$. Ber. C 31,69, H 3,39, N 10,56, Br 30,19.
Gef. „ 32,05, „ 3,54, „ 10,41, 10,49, „ 30,01.

Die Verbindung bräunt sich beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 190° und schmilzt unter Zersetzung gegen 198° (korr. 202°). Sie kristallisiert in mikroskopisch kleinen Prismen. Sie löst sich ziemlich leicht in warmem Alkohol, aber schwer in Aceton, Chloroform und fast gar nicht in Äther und Petroläther.

Die Säure reduziert in Natriumcarbonatlösung Permanganat momentan. Sie verliert ferner in ammoniakalischer Lösung schon in der Kälte Halogen. Über das hierbei entstehende Produkt soll später berichtet werden.

Auch bei dieser Untersuchung habe ich mich der überaus geschickten und tatkräftigen Mitwirkung meines Assistenten Dr. H. Leuchs erfreut, wofür ich ihm gerne meinen herzlichen Dank ausspreche.

---

27. Emil Fischer und Umetaro Suzuki: Synthese von Polypeptiden. III. Derivate der α-Pyrrolidincarbonsäure.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 37, 2842 (1904).
(Eingegangen am 22. Juli.)

Nach den Beobachtungen von Willstätter[1]) wird die α, δ-Dibromvaleriansäure durch Ammoniak in α-Pyrrolidincarbonsäure verwandelt. Es schien deshalb möglich, auf ähnliche Art das Radikal der Pyrrolidincarbonsäure mit anderen Aminosäuren zu Polypeptiden zu vereinigen. Bei einem Versuche mit Alanin haben wir diese Vermutung bestätigt gefunden. Wird das Chlorid der α, δ-Dibromvaleriansäure mit einer alkalischen Lösung von Alanin zusammengebracht, so entsteht in reichlicher Menge das α, δ-Dibromvalerylalanin, $CH_2Br.CH_2.CH_2.CHBr.CO.NH.CH(COOH).CH_3$, und bei Einwirkung von wässerigem Ammoniak verwandelt sich dieses in das Dipeptid,

$$\underbrace{CH_2.CH_2.CH_2.CH}_{NH}.CO.NH.CH\langle{}^{COOH}_{CH_3}\ .$$

Daß die Verbindung wirklich diese Stuktur besitzt, ließ sich durch die hydrolytische Spaltung in Alanin und α-Pyrrolidincarbonsäure leicht beweisen. Die Neigung zur Bildung des Pyrrolidinrings muß bei der Einwirkung des Ammoniaks auf die Derivate der α,δ-Dibromvaleriansäure sehr groß sein; denn wir haben das Ornithinderivat, $CH_2(NH_2).CH_2.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH(COOH)CH_3$, dessen gleichzeitige Bildung zu erwarten war, vergebens gesucht.

Da die α-Pyrrolidincarbonsäure ein Bestandteil der meisten Proteïnstoffe ist, so darf die neue Methode als recht willkommene Erweiterung der Polypeptidsynthese betrachtet werden; denn sie wird voraussichtlich die Einführung des Radikals der Pyrrolidincarbonsäure in zahlreiche Polypeptide gestatten.

Für die Benennung derartiger Kombinationen ist das Wort α-Pyrrolidincarbonsäure zu lang. Wir halten es deshalb für zweckmäßig, das

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 1160 [1900].

abgekürzte Wort „Prolin", dessen Ableitung aus Pyrrolidin leicht verständlich ist, vorzuschlagen. Das oben angeführte Dipeptid erhält also den Namen „Prolylalanin".

Da wir für die neue Synthese racemisches Alanin benutzten, so sind die sämtlichen Produkte optisch-inaktiv. Was die Bildung von Stereoisomeren betrifft, so gelten auch hier die in der Abhandlung II[1]) mitgeteilten Betrachtungen. Schon bei dem Dibromvalerylalanin sind wegen der Anwesenheit von zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen zwei inaktive Formen möglich. Wir werden auf diesen Punkt bei der Beschreibung der Versuche zurückkommen.

α,δ-Dibromvalerylchlorid, $CH_2Br.CH_2.CH_2.CHBr.COCl$.

Die als Ausgangsmaterial dienende α,δ-Dibromvaleriansäure ist zwar von Willstätter und Ettlinger[2]) schon aus dem von ihnen entdeckten α,δ-Dibrompropylmalonester durch Verseifung mit Bromwasserstoff gewonnen worden. Da sie aber keine näheren Angaben über die Darstellung machen, so halten wir es für angezeigt, unsere Erfahrungen darüber mitzuteilen.

Wir erhitzten 50 g α, δ-Dibrompropylmalonester mit 250 g käuflicher Bromwasserstoffsäure, die bei 0^0 gesättigt war, am Rückflußkühler etwa eine Stunde zum Kochen, bis nur noch wenig Bromwasserstoffgas mehr wegging. Das anfangs oben schwimmende Öl sank während der Operation allmählich zu Boden; diese wurde unterbrochen, als eine Probe des Öles sich in verdünntem Alkali klar löste. Längeres Erhitzen mit Bromwasserstoff über den oben angegebenen Zeitpunkt hinaus ist nicht ratsam, weil dann die α, δ-Dibromvaleriansäure eine weitere Zersetzung erleiden kann.

Zur Isolierung der Dibromvaleriansäure verdünnt man die Mischung mit Wasser, extrahiert mit Äther, trocknet die ätherische Lösung mit Natriumsulfat, verdampft den Äther und fraktioniert den öligen Rückstand im Vakuum. Bei 13—15 mm Druck ist die Dibromvaleriansäure in der bei 165—175^0 siedenden Fraktion enthalten. Durch eine zweite Fraktionierung bei demselben Druck wurde die Säure als fast farbloses dickes Öl, das bei 171—174^0 kochte, gewonnen. Die Ausbeute betrug bei gut verlaufener Operation ungefähr 30 g. Analysiert haben wir das Präparat nicht.

Die Verwandlung der Säure in das Chlorid gelingt leicht mittels Phosphorpentachlorid, und an Stelle des fraktionierten Präparates kann man auch die rohe Säure verwenden, die bei Abdampfen der ätherischen

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2487 [1904]. (*S. 338.*)

[2]) Willstätter und Ettlinger, Liebigs Annal. **326**, 99.

Lösung zuletzt im Vakuum zurückbleibt; nur muß man in letzterem Falle wegen der geringen Menge Wasser, die dem Präparate anhaftet, etwas mehr Phosphorpentachlorid anwenden. Bei Benutzung der fraktionierten Säure trägt man in 40 g derselben allmählich etwa 35 g Phosphorpentachlorid ein, wobei eine lebhafte Reaktion stattfindet. Wenn diese beendet ist, muß noch etwas unverändertes Phosphorpentachlorid vorhanden sein. Man gießt davon ab, und fraktioniert die Flüssigkeit im Vakuum. Durch zweimalige Fraktionierung bei 13—15 mm Druck wurde das α,δ-Dibromvalerylchlorid als farbloses, stechend riechendes Öl vom Sdp. 122—127° gewonnen. Die Ausbeute betrug ungefähr 85% der Theorie. Wir haben auch dieses Präparat nicht analysiert.

α,δ-Dibromvalerylalanin,
$CH_2Br.CH_2.CH_2.CHBr.CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

5 g synthetisches Alanin wurden in 100 ccm Normal-Natronlauge gelöst und dazu bei gewöhnlicher Temperatur allmählich und abwechselnd 16 g α,δ-Dibromvalerylchlorid und 75 ccm Normal-Natronlauge im Laufe von einer halben Stunde unter tüchtigem Schütteln zugegeben. Zum Schluß der Operation ist zwar der Geruch des Chlorides ganz verschwunden, aber die Flüssigkeit nicht ganz klar, sondern durch geringe Mengen eines Öles getrübt. Dieses wird durch Ausäthern entfernt, dann die alkalische Lösung mit 125 ccm Normal-Salzsäure versetzt und das hierdurch ausgeschiedene Öl wiederholt durch Äther extrahiert. Beim Verdampfen des Äthers bleibt ein farbloses, zähes Öl, das mit etwa 50 ccm Wasser kurze Zeit auf dem Wasserbade digeriert wird und dann beim Abkühlen in farblosen Nadeln kristallisiert. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 15 g, was ungefähr 80% der Theorie entspricht. Durch einmaliges Umkristallisieren aus kochendem Wasser erhält man die Verbindung in seidenglänzenden Nadeln, die für die Analyse bei 80° getrocknet wurden.

0,1502 g Sbst.: 0,1615 g CO_2 0,0529 g H_2O. — 0,1918 g Sbst.: 7,2 ccm N (23°, 759 mm).

$C_8H_{13}NO_3Br_2$. Ber. C 29,00, H 3,93, N 4,23.
Gef. „ 29,32, „ 3,91, „ 4,27.

Die Substanz ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich; beim Kochen damit schmilzt sie und löst sich gleichzeitig in reichlicher Menge. In Alkohol, Äther und Benzol ist sie leicht, in Petroläther dagegen sehr schwer löslich. Der Schmelzpunkt ist nicht ganz konstant. Sie beginnt gegen 110° zu sintern und schmilzt zwischen 113—116° (korr.) zu einem farblosen Öl.

Es ist möglich, daß unser Präparat ein Gemisch von zwei Isomeren war, worauf die Unregelmäßigkeit des Schmelzpunktes hinzudeuten scheint. Wir müssen aber hinzufügen, daß es uns nicht gelungen ist, durch Kristallisation eine Trennung zu bewerkstelligen.

Prolylalanin, $\underbrace{CH_2.CH_2.CH_2.CH}_{NH}.CO.NH.CH\begin{matrix} COOH \\ CH_3 \end{matrix}$.

Die Wechselwirkung zwischen Dibromvalerylalanin und wässerigem Ammoniak führt im wesentlichen zum selben Resultat, einerlei, ob sie bei 0^0 oder bei 100^0 stattfindet; nur erfordert sie im ersten Falle ungefähr zwei Tage, im letzten Falle dagegen kaum eine Stunde, falls ein großer Überschuß von Ammoniak verwendet wird. Um Zeit zu sparen, haben wir deshalb bei höherer Temperatur gearbeitet und folgende Bedingung innegehalten:

5 g Dibromvalerylalanin erhitzt man mit 25 ccm Ammoniak von 25% im geschlossenen Rohr $^1/_2$ Stunde auf 100^0, dann verdampft man die klare Lösung auf dem Wasserbade. Dabei bleibt ein fast farbloser Sirup, der auf Zusatz von Alkohol eine reichliche Menge von farblosen, seidenglänzenden Kristallen abscheidet. Die Ausbeute an diesem schon fast reinen Produkt betrug durchschnittlich 1,5 g oder 54% der Theorie.

Die Verarbeitung der Mutterlauge werden wir unten beschreiben.

Zur vollständigen Reinigung wird das Präparat aus kochendem 80-prozentigem Spiritus umkristallisiert. Es bildet eine farblose, seidenglänzende Kristallmasse, die unter dem Mikroskop als sehr dünne, langgestreckte, schmale Plättchen erscheint. Für die Analyse war im Toluolbad getrocknet:

0,1237 g Sbst.: 0,2322 g CO_2, 0,0825 g H_2O. — 0,1295 g Sbst.: 17,2 ccm N (20^0, 758 mm).

$C_8H_{14}N_2O_3$. Ber. C 51,55, H 7,53, N 15,05.
Gef. „ 51,20, „ 7,41, „ 15,14.

Das Prolylalanin reagiert auf Lakmus schwach sauer und ist fast geschmacklos. Es löst sich sehr leicht in Wasser, aber sehr schwer in absolutem Alkohol und fast gar nicht in Äther, Benzol, Chloroform, Petroläther. Sowohl die neutrale, wie die mit Schwefelsäure versetzte wässerige Lösung gibt mit Phosphorwolframsäure einen starken farblosen Niederschlag, der sich beim Erwärmen in reichlicher Menge löst und beim Erkalten wieder ausfällt. Das Dipeptid löst Kupferoxyd mit schön blauer Farbe und beim Verdampfen der Lösung bleibt das Kupfersalz als kristallinische Masse zurück. Es ist in Wasser sehr leicht löslich.

Das Prolylalanin hat keinen konstanten Schmelzpunkt; bei raschem Erhitzen im Kapillarrohr schmilzt es zwischen 225—230° (korr.) unter starkem Aufschäumen; es verliert nämlich Wasser und verwandelt sich in das unten ausführlich beschriebene Anhydrid, das wir als ein Derivat des Diacipiperazins auffassen[1]).

Durch längeres Erhitzen mit Salzsäure wird das Prolylalanin, wie alle Polypeptide, völlig in seine Komponenten d. h. in Alanin und Prolin (α-Pyrrolidincarbonsäure) gespalten, wie folgender Versuch zeigt.

1 g Prolylalanin wurde in 5 ccm rauchender Salzsäure gelöst und in einem Platintiegel auf dem Wasserbade unter zeitweisem Ersatz der verdampfenden Säure 2 Stunden erhitzt; zum Schluß wurde die Lösung möglichst vollständig eingedampft, der Rückstand in 10 ccm Wasser gelöst, durch Schütteln mit Silberoxyd von Chlor völlig befreit, aus der Mutterlauge das gelöste Silber quantitativ mit Salzsäure gefällt, und die abermals filtrierte Lösung zur Trockne verdampft. Der Rückstand war zum größten Teil kristallisiert. Um alles Wasser zu entfernen, wurde zuerst mit etwas Alkohol wieder abgedampft und dann zur Trennung der beiden Aminosäuren mit 25 ccm absolutem Alkohol $^1/_2$ Stunde ausgekocht.

Die Menge des zurückbleibenden Alanins war 0,4 g oder 84% der Theorie. Nach einmaligem Lösen mit Wasser und Fällen mit Alkohol schmolz das Präparat gleichzeitig mit reinem Alanin und besaß auch die übrigen Eigenschaften dieser Aminosäure.

Die alkoholische Mutterlauge hinterließ beim Verdampfen das Prolin, anfänglich als Sirup, der aber beim Stehen im Exsikkator völlig kristallisierte. Es wurde in das sehr charakteristische Kupfersalz verwandelt. An der Luft getrocknet zeigte dieses die Zusammensetzung des racemischen Prolinkupfers $(C_5H_8NO_2)_2Cu + 2\,H_2O$.

0,1522 g Sbst. verloren im Toluolbad 0,0168 g H_2O. — 0,1663 g Sbst. gaben 0,0400 g CuO.

Ber. H_2O 10,99, Cu 19,41.
Gef. „ 11,04, „ 19,18.

Die alkoholische Mutterlauge, die bei der zuvor beschriebenen Reinigung des Prolylalanins resultierte, enthält neben Ammonbromid noch reichliche Mengen von Dipeptid. Will man dies gewinnen, so ist es ratsam, nach dem Abdampfen des Alkohols und Lösen des Rückstandes in Wasser zuerst das Brom durch Silbersulfat und Baryumcarbonat zu entfernen und dann das in der Lösung enthaltene Ammoniumcarbonat durch Verdampfen zu vertreiben. Aus dem schließlich zurück-

[1]) Die gleiche Reaktion zeigen manche anderen Dipeptide, worüber später berichtet werden soll. E. Fischer.

bleibenden Sirup wurde durch Behandlung mit Alkohol noch eine kleine Menge, ungefähr 12% der Theorie, reines Prolylalanin gewonnen, so daß die gesamte Ausbeute an diesem Präparate 66% der Theorie betrug.

Aus der Mutterlauge wurde noch ein Produkt gewonnen, von dem wir nicht sicher sagen können, ob es unreines Prolylalanin oder ein Stereoisomeres ist. Seine Menge betrug ungefähr 10% des angewandten Dibromvalerylalanins oder 20% der Theorie. Es schmolz 20—25° niedriger wie das Prolylalanin, bildete ein undeutlich kristallinisches Pulver, das unter dem Mikroskop als warzenartige Kristallaggregate erschien. Es war sowohl in Wasser, wie in verdünntem Alkohol leichter löslich als das Prolylalanin, glich ihm aber im sonstigen Verhalten sehr.

0,1779 g Sbst.: 0,3338 g CO_2, 0,1194 g H_2O. — 0,1281 g Sbst.: 17,2 ccm N (22°, 765 mm).

$C_8H_{14}N_2O_3$. Ber. C 51,55, H 7,53, N 15,05.
Gef. „ 51,17, „ 7,46, „ 15,31.

Prolylalaninanhydrid, $\begin{array}{l} CH_2.CH_2 \\ \vdots \\ CH_2.CH \end{array} \!\!\begin{array}{l} \searrow N \text{——} CO \searrow \\ \swarrow CO \text{—} NH \nearrow \end{array} CH.CH_3$.

Erhitzt man Prolylalanin in einem Bade auf 225°, so schmilzt es unter Aufschäumen und Abgabe von Wasser; wenn die Masse ruhig fließt, ist die Reaktion beendet. Nach dem Erkalten wurde der glasartige Rückstand in etwa der 4—5-fachen Menge heißem Benzol gelöst und diese Lösung ungefähr mit dem gleichen Volumen heißem Ligroïn überschichtet. Beim Erkalten schied sich langsam das Anhydrid in farblosen kleinen Prismen ab. Nach längerem Stehen betrug ihre Menge 80% des angewandten Dipeptid, oder 89% der Theorie.

Für die Analyse wurde das Präparat noch zweimal in heißem Benzol gelöst, durch Ligroïn wieder abgeschieden und im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,1518 g Sbst.: 0,3163 g CO_2, 0,1016 g H_2O. — 0,1415 g Sbst.: 20,2 ccm N (20°, 766 mm).

$C_8H_{12}N_2O_2$. Ber. C 57,14, H 7,14, N 16,66.
Gef. „ 56,82, „ 7,44, „ 16,46.

Das Anhydrid schmilzt nicht ganz konstant bei 126—129° (korr.) ohne Gasentwickelung. Es ist sehr leicht löslich in Äther und fast unlöslich in Ligroïn. Die wässerige Lösung reagiert neutral und schmeckt ziemlich stark bitter. Von dem Dipeptid unterscheidet es sich scharf durch das Verhalten gegen Kupferoxyd; denn seine wässerige Lösung nimmt beim kurzen Kochen mit gefälltem Kupferoxyd gar keine Färbung an.

28. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. IV. Derivate des Phenylalanins.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 37, 3062 (1904).
(Eingegangen am 3. August.)

Für die Synthese der Polypeptide sind bisher nur vier halogenhaltige Säurechloride: Chloracetyl-, Brompropionyl-, α-Bromisocapronyl- und α, δ-Dibromvalerylchlorid benutzt worden. Sie gestatten die Einführung von Glycyl, Alanyl, Leucyl und Prolyl. Um auf die gleiche Art das Radikal des Phenylalanins mit anderen Aminosäuren zu verkuppeln, bedarf man des Chlorids einer Phenyl-α-halogenpropionsäure. Diese Verbindungen sind noch unbekannt, und ich habe mich selbst überzeugt, daß die gewöhnliche Methode, α-Bromderivate mit Hilfe von Brom und Phosphor zu bereiten, bei der Phenylpropionsäure (Hydrozimmtsäure) versagt, weil während der Reaktion Zimmtsäure gebildet wird, die dann noch sekundär mit dem Brom sich verbinden kann.

Für die Bereitung der Phenyl-α-brompropionsäure mußte also ein neuer Weg gesucht werden. Er hat sich in folgender Reaktion gefunden, die gewiß auch für manche analogen Fälle in der aromatischen Reihe brauchbar ist. Die von M. Conrad[1]) beschriebene und für die Synthese von Hydrozimmtsäure benutzte Benzylmalonsäure nimmt sehr leicht ein Atom Brom auf, und die hierbei entstehende Benzylbrommalonsäure, $C_6H_5.CH_2.CBr\langle{}^{CO_2H}_{CO_2H}$, verwandelt sich beim Erhitzen unter Abgabe von Kohlensäure in Phenyl-α-brompropionsäure (α-Bromhydrozimmtsäure). Daß der Säure die Strukturformel $C_6H_5.CH_2.CHBr.CO_2H$, zukommt, beweist ihr Verhalten gegen Ammoniak; denn sie wird dadurch in das racemische Phenylalanin verwandelt, und diese neue Synthese ist so leicht auszuführen, daß sie zur praktischen Darstellung der Aminosäure empfohlen werden kann.

Aus der Phenyl-α-brompropionsäure läßt sich in der üblichen Weise leicht das entsprechende Chlorid bereiten, und seine Brauchbarkeit für

[1]) Ann. d. Chem. 204, 174.

die Synthese von Polypeptiden wurde durch Kombination mit Glycylglycin und mit Phenylalanin festgestellt.

Im ersten Falle verläuft die Synthese recht glatt und führt zu dem schön kristallisierenden Tripeptid Phenylalanylglycylglycin:

$$C_6H_5.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H.$$

Etwas schwieriger gestaltet sich die Synthese in dem zweiten Falle; schon die Wechselwirkung zwischen dem Phenyl-α-brompropionylchlorid und dem Phenylalanin gibt keine besonders gute Ausbeute, aber noch erheblich schlechter ist der Erfolg bei der Einwirkung des Ammoniaks auf das Phenylbrompropionylphenylalanin; denn als Hauptprodukt entsteht hierbei durch Abspaltung von Bromwasserstoff das Cinnamoylphenylalanin,

$$C_6H_5.CH:CH.CO.NH.CH(CO_2H).CH_2.C_6H_5,$$

und nur in relativ kleiner Menge konnte das bisher unbekannte Phenylalanylphenylalanin isoliert werden.

Die vorstehende Methode ist gewiß geeignet, zahlreiche Kombinationen des Phenylalanins zu bereiten. So entsteht nach Versuchen des Herrn Dr. Webster das gut kristallisierende Phenylalanylglycin in guter Ausbeute. Mit kleinen Variationen wird das Verfahren auch die Einführung anderer aromatischer Aminosäuren in die Polypeptide gestatten. Man darf sogar hoffen, durch Benutzung der *p*-Nitrobenzylmalonsäure das Radikal des Tyrosins auf ähnliche Art einschieben zu können.

Benzyl-brom-malonsäure, $C_6H_5.CH_2.CBr\begin{matrix}\diagup CO_2H\\ \diagdown CO_2H\end{matrix}$.

Die Bromierung der Benzylmalonsäure geht sehr energisch vonstatten. Man löst 50 g in 250 g trocknem Äther und setzt allmählich 55 g Brom ($1^1/_3$ Mol.-Gew.) zu. Das Halogen verschwindet anfangs sehr rasch, und es entwickelt sich massenhaft Bromwasserstoff. Zum Schluß ist die Flüssigkeit durch überschüssiges Brom rotbraun gefärbt. Nach $^1/_2$-stündigem Stehen wird die ätherische Lösung mit etwas Wasser geschüttelt, um den größten Teil des Bromwasserstoffes zu absorbieren, dann abgehoben, verdunstet und der feste Rückstand aus etwa 250 ccm heißem Toluol umkristallisiert. Die Ausbeute ist sehr befriedigend. Sie betrug 70 g wasserhaltige oder 67 g trockne Säure, und das entspricht etwa 95% der Theorie.

Für die Analyse war das Produkt nochmals aus der 3-fachen Menge heißem Toluol umkristallisiert. Das im Exsikkator getrocknete Produkt schmolz bei 109—110°, enthielt aber noch etwas Kristallwasser, das

beim Erhitzen im Vakuum auf 80° entwich. Der Gewichtsverlust betrug 4,4%. Da aber dieser Wert etwa $^2/_3$ Molekül Wasser entspricht und mithin für keine einfache Formel paßt, so liegt die Vermutung nahe, daß das analysierte Präparat in bezug auf Kristallwasser nicht ganz einheitlich war.

Die trockne Substanz schmolz unter Gasentwickelung nicht ganz konstant gegen 135° (korr. 137°) und gab folgende Zahlen:

0,1874 g Sbst.: 0,3050 g CO_2, 0,0560 g H_2O. — 0,2034 g Sbst.: 0,1409 g AgBr.

$C_{10}H_9O_4Br$. Ber. C 43,95, H 3,30, Br 29,30.
Gef. „ 44,39, „ 3,35, „ 29,56.

Die Säure ist in Alkohol, Äther, Essigester leicht und dann gradweise schwerer löslich in Benzol, Chloroform und Ligroïn. Auch in heißem Wasser löst sie sich leicht, schwerer in kaltem. Sie kristallisiert aus Wasser in Prismen, die meist zwillingsartig verwachsen sind. Aus Chloroform scheidet sie sich in sechsseitigen kleinen Tafeln ab. Am bequemsten wird sie aus Toluol umgelöst, worin sie in der Hitze viel leichter löslich ist als in der Kälte. Die wässerige Lösung gibt erst beim Kochen mit Silbernitrat einen Niederschlag von Bromsilber.

β-Phenyl-α-brom-propionsäure (α-Brom-hydrozimmtsäure), $C_6H_5.CH_2.CHBr.CO_2H$.

Wird die wasserhaltige Benzylbrommalonsäure im Ölbade auf 125—130° erhitzt, so beginnt in der geschmolzenen Masse eine starke Entwicklung von Gas, das hauptsächlich aus Kohlensäure besteht, aber auch wenig Bromwasserstoff enthält. Die Operation wird nach $^1/_2$—$^3/_4$ Stunden unterbrochen, wenn die Gasentwickelung sehr schwach geworden ist. Der Rückstand bildet dann ein gelbes Öl, das auch bei niedriger Temperatur nicht kristallisiert und im wesentlichen aus Phenyl-α-brompropionsäure besteht. Es wurde zur Reinigung mit Wasser gewaschen, mit Äther aufgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther wieder verdampft. Das so resultierende, leicht flüssige, fast farblose Öl ist in Alkohol und Äther sehr leicht, in Wasser und Petroläther sehr schwer löslich. Leider läßt es sich auch bei stark vermindertem Druck nicht destillieren, ohne eine teilweise Zersetzung unter Bildung von Bromwasserstoff zu erfahren. Es wurde deshalb nicht analysiert. Es löst sich in kalten, sehr verdünnten Alkalien und in Ammoniak und wird durch Säuren wieder gefällt. Die ammoniakalische Lösung gibt mit Silbernitrat einen dicken, käsigen Niederschlag. Mit konzentrierter Natronlauge erwärmt sich das Öl stark und gibt sofort eine Kristallisation von zimmtsaurem Natrium.

Neue Synthese des Phenylalanins.

Wie oben erwähnt, wird die Phenylbrompropionsäure durch Ammoniak leicht in Phenylalanin verwandelt. Man löst zu dem Zweck das Rohprodukt, das durch Erhitzen der Benzylbrommalonsäure auf 130° entsteht, in der 5-fachen Menge wässerigem Ammoniak von 25% und erhitzt entweder im geschlossenen Gefäß 3 Stunden auf 100° oder läßt bei gewöhnlicher Temperatur 3—4 Tage stehen. Wird dann die ammoniakalische Lösung zur Trockne verdampft, so hinterbleibt ein fast farbloser Rückstand, der außer Bromammonium und Phenylalanin wenig Zimmtsäure und eine kleine Menge eines anderen stickstoffhaltigen, organischen Körpers enthält. Beim Auskochen mit Alkohol bleibt nur das Phenylalanin zurück, und einmaliges Umlösen aus heißem Wasser genügt, um ein reines Präparat zu gewinnen.

0,1641 g Sbst.: 0,3947 g CO_2, 0,1005 g H_2O.

$C_9H_{11}O_2N$. Ber. C 65,46, H 6,66.

Gef. „ 65,60, „ 6,80.

Das Produkt wurde durch den Schmelzpunkt, das schwer lösliche Hydrochlorat und die Oxydation zu Phenylacetaldehyd mit dem racemischen Phenylalanin identifiziert.

Die Ausbeute betrug 60% der Theorie, berechnet auf die angewandte Benzylbrommalonsäure. Da die Umwandlung des käuflichen Benzylmalonesters in Benzylbrommalonsäure keine Schwierigkeiten bietet, so ist dieses neue Verfahren für die praktische Darstellung des Phenylalanins ebensogut geeignet, wie die bekannte Synthese von Erlenmeyer jun., bei der Hippursäure als Ausgangsmaterial dient.

β-Phenyl-α-brom-propionylchlorid.

Zu seiner Bereitung kann die rohe Phenylbrompropionsäure dienen, wie sie durch Erhitzen der Benzylbrommalonsäure gewonnen wird. Das aus 10 g der letzteren erhaltene Produkt wird auf 15 g Phosphorpentachlorid gegossen, wobei lebhafte Entwickelung von Salzsäure stattfindet. Zur Entfernung von überschüssigem Pentachlorid wird das Gemisch mit Äther aufgenommen und die filtrierte Lösung nach dem Verdunsten des Äthers unter stark vermindertem Druck destilliert. Das Chlorid ging unter 12 mm Druck bei 132—133° (korr.) über. Auf Benzylbrommalonsäure berechnet, betrug die Ausbeute ungefähr 75% der Theorie.

Für die Analyse diente ein Präparat, das zweimal bei 12 mm Druck fraktioniert war. Es wurden zunächt Brom und Chlor zusammen als Silbersalz nach Carius bestimmt und dann das Gemisch durch schwaches Glühen im Chlorstrom völlig in Chlorsilber verwandelt.

0,3701 g Sbst.: 0,4898 g AgBr + AgCl 0,4237 g AgCl.

C_9H_8OBrCl. Ber. Br 32,3, Cl 14,3.
Gef. „ 32,1, „ 14,1.

Das reine Chlorid ist ein farbloses und stechend riechendes Öl.

Phenyl-α-brom-propionyl-glycylglycin, $C_6H_5.CH_2.CHBr.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$.

5 g salzsaures Glycylglycin werden in 54 ccm Normal-Natronlauge gelöst und auf 0° abgekühlt. Dazu fügt man abwechselnd unter Schütteln in kleinen Portionen 6,6 g Phenylbrompropionylchlorid, das in der 3-fachen Menge Äther gelöst ist, und 54 ccm Normal-Natronlauge. Die Flüssigkeit wird während dessen fortdauernd bei 0° gehalten. Beim Ansäuern fällt das neue Produkt kristallinisch aus, während die in kleinerer Menge regenerierte Phenylbrompropionsäure von dem Äther aufgenommen wird. Nach einigem Stehen bei 0° wird die kristallinische Masse abgesaugt. Die Ausbeute betrug 6 g oder 65% der Theorie. Zur Analyse wurde aus der 15-fachen Menge warmem Wasser umkristallisiert.

0,1807 g Sbst.: 0,3033 g CO_2, 0,0720 g H_2O. — 0,2038 g Sbst.: 14,3 ccm N (19°, 706 mm). — 0,1869 g Sbst.: 0,1008 g AgBr.

$C_{13}H_{15}O_4N_2Br$. Ber. C 45,49, H 4,38, N 8,17, Br 23,32.
Gef. „ 45,78, „ 4,43, „ 8,07, „ 22,95.

Die Verbindung schmilzt unter Gelbfärbung bei 155—156° (korr. 157—158°). Sie löst sich in etwa 8 Teilen heißem Wasser und kristallisiert daraus in mikroskopisch kleinen, schlecht ausgebildeten Prismen. In heißem Alkohol ist sie recht leicht, in Äther, Benzol und Chloroform dagegen äußerst schwer löslich.

Phenylalanyl-glycylglycin, $C_6H_5.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2.H$.

Wird die vorhergehende Verbindung in der 5-fachen Menge Ammoniak von 25% gelöst und 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so ist alles Brom abgespalten, und beim Verdampfen auf dem Wasserbade bleibt das neue Polypeptid neben Bromammonium als kristallinische Masse zurück. Sie wird zunächst mit heißem Alkohol ausgelaugt, wobei außer Bromammonium ein später näher beschriebenes Nebenprodukt in Lösung geht. Die Ausbeute betrug 61% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wurde in 20 Teilen Wasser gelöst und durch 60 Teile Alkohol wieder gefällt, wobei ungefähr $^1/_5$ in der Mutterlauge blieb. Für die Analyse war bei 110° getrocknet.

0,1856 g Sbst.: 0,3803 g CO_2, 0,1043 g H_2O. — 0,1707 g Sbst.: 22,4 ccm N (21°, 768 mm).

$C_{13}H_{17}O_4N_3$. Ber. C 55,87, H 6,13, N 15,06.
Gef. „ 55,89, „ 6,24, „ 15,10.

Die Substanz schmilzt nicht konstant beim raschen Erhitzen gegen 230° (korr. 235°) unter Zersetzung, wobei sie sich zuerst rot und dann dunkel färbt. Sie kristallisiert aus Wasser in dünnen, schiefen, vierseitigen Tafeln, die häufig ausgezackt sind. Sie löst sich in etwa 12 Teilen heißem Wasser, und bei gewöhnlicher Temperatur fällt sie etwa zur Hälfte wieder aus. In Alkohol ist sie sehr schwer löslich, und von den anderen gebräuchlichen, organischen Lösungsmitteln wird sie so gut wie gar nicht aufgenommen. Die wässerige Lösung reagiert auf Lakmus schwach sauer und löst Kupferoxyd beim Kochen mit tiefblauer Farbe.

Neben Phenylalanylglycylglycin bildet sich ein nicht basisches Produkt von der Formel $C_{13}H_{14}O_4N_2$.

Es entsteht aus dem Phenylbrompropionylglycylglycin durch Abspaltung von Bromwasserstoff. Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß es ein Cinnamoylglycylglycin sei. Seine direkte Synthese aus Zimmtsäurechlorid und Glycylglycin hat diesen Schluß bestätigt.

Cinnamoyl-glycylglycin,

$$C_6H_5.CH:CH.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2H.$$

Wie oben bemerkt, wird diese Substanz beim Auslaugen des rohen Phenylalanylglycins mit kochendem Alkohol nebst Bromammonium gelöst. Man verdampft den Alkohol, wäscht den Rückstand mit kaltem Wasser und kristallisiert ihn aus heißem Alkohol.

0,1930 g Sbst.: 0,4213 g CO_2, 0,0943 g H_2O. — 0,1825 g Sbst.: 16,8 ccm N (18°, 768 mm).

$C_{13}H_{14}O_4N_2$. Ber. C 59,54, H 5,34, N 10,68.
Gef. „ 59,53, „ 5,43, „ 10,75.

Die Substanz schmolz im Kapillarrohr bei 225—226° (korr. 229 bis 230°) unter Braunfärbung.

Sie ist in Wasser und auch in kaltem Alkohol schwer löslich und kristallisiert aus heißem Alkohol oder Wasser in mikroskopisch kleinen Prismen. Sie löst sich leicht in Alkalien und wird durch Säuren wieder gefällt. Die wässerige Lösung reagiert stark sauer. Die Ausbeute betrug ungefähr 20% des angewandten Phenylbrompropionylglycylglycins.

Bequemer wird der Körper aus dem Chlorid der Zimmtsäure gewonnen. Man löst zu dem Zweck 3 g salzsaures Glycylglycin in 32 ccm

Normal-Natronlauge (2 Mol.), kühlt auf 0⁰ ab und fügt im Laufe von etwa 20 Minuten unter Schütteln abwechselnd eine Lösung von 4 g Cinnamoylchlorid in 40 ccm Äther und 32 ccm Normal-Natronlauge zu. Beim Ansäuern fällt ein kristallinischer Niederschlag aus, der neben dem gesuchten Körper auch Zimmtsäure enthält. Letztere wird nach dem Abfiltrieren durch Äther ausgelaugt. Die Ausbeute an rohem Cinnamoylglycylglycin betrug 3,6 g oder 85% der Theorie und das Produkt schmolz bei 221^0. Durch einmaliges Umlösen ging der Schmelzpunkt auf 225^0.

Phenyl-brompropionyl-α-phenylalanin,

$$C_6H_5.CH_2.\overset{*}{C}HBr.CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}.$$

Wie früher angegeben, geht die Vereinigung des Phenylalanins mit dem Phenylbrompropionylchlorid nicht glatt vonstatten. Die Ausbeute an kristallisiertem Produkt läßt zu wünschen übrig und war am besten bei folgenden Bedingungen: 3 g inaktives Phenylalanin wurden in 18,3 ccm Normal-Natronlauge (1 Mol.) gelöst, auf 0^0 abgekühlt und dazu abwechselnd in kleinen Portionen im Laufe von 10 Minuten gegeben 36,6 ccm abgekühlte Normal-Natronlauge (2 Mol.) und 4,5 g Phenylbrompropionylchlorid (1 Mol.), das in der 3-fachen Menge Äther gelöst war. Dann wurde mit ungefähr 40 ccm Normal-Salzsäure angesäuert, das in Freiheit gesetzte ölige Reaktionsprodukt ausgeäthert und der beim Verdampfen des Äthers bleibende sirupöse Rückstand in etwa 40 ccm Benzol gelöst. Beim Abkühlen auf 0^0 begann bald die Kristallisation des β-Phenyl-α-brompropionylphenylalanins. Nach mehrstündigem Stehen betrug die Menge der Kristalle 2,4 g oder 35% der Theorie. Die Verarbeitung der Mutterlauge hat bisher kein greifbares Resultat gegeben. Für die Analyse war zweimal aus 50-prozentigem Spiritus umgelöst und im Vakuumexsikkator getrocknet.

0,1801 g Sbst.: 0,3793 g CO_2, 0,0785 g H_2O. — 0,2577 g Sbst.: 8,3 ccm N (19^0, 767 mm). — 0,1625 g Sbst.: 0,0809 g AgBr.

$C_{18}H_{18}O_3NBr$. Ber. C 57,44, H 4,79, N 3,73, Br 21,28.
Gef. „ 57,44, „ 4,84, „ 3,74, „ 21,19.

Die Verbindung schmilzt bei 171—172^0 (korr. 174—175^0). Sie bildet eine farblose, kristallinische Masse; unterm Mikroskop erkennt man meist schlecht ausgebildete, achtseitige Tafeln, die aber gewöhnlich eiförmig abgerundet sind. Sie ist leicht löslich in Alkohol, Aceton und Essigester, ziemlich leicht löslich in Äther und kochendem Chloroform oder Benzol, schwer löslich in kaltem Benzol und äußerst schwer in Wasser und Petroläther.

Phenylalanyl-phenylalanin,

$$\underset{\textstyle NH_2}{C_6H_5.CH_2.\dot{C}H}.CO.NH.\underset{\textstyle COOH}{\dot{C}H}.CH_2.C_6H_5 \,.$$

Schüttelt man 2 g gepulvertes Phenylbrompropionylphenylalanin bei etwa 25° mit 10 ccm wässerigem Ammoniak von 25%, so löst es sich auf; nach 3-tägigem Stehen bei derselben Temperatur ist alles Brom abgespalten und in der Regel ein Niederschlag entstanden. Ohne Filtration wird die Flüssigkeit zur Verjagung des Ammoniaks verdampft. Den Rückstand laugt man zuerst mit etwas kaltem Wasser aus, um das Bromammonium zu entfernen, und kocht ihn dann mit Alkohol. Dabei geht das gleich zu beschreibende Cinnamoylphenylalanin, welches Hauptprodukt der Reaktion ist, in Lösung, während das Dipeptid ziemlich rein zurückbleibt. Die Ausbeute betrug nur 0,25 g, und alle Abänderungen der Methode haben bisher nur schlechtere Resultate ergeben. Zur Reinigung wird das Produkt aus ungefähr 300 Teilen kochendem Wasser umkristallisiert. Es bildet dann kleine Prismen, die unter dem Mikroskop meist sechsseitig erscheinen und im lufttrocknen Zustande 2 Mol. Kristallwasser enthalten.

0,1409 g Sbst. verloren bei einstündigem Erhitzen auf 110° 0,015 g H_2O.

$C_{18}H_{20}O_3N_2 + 2\,H_2O$. Ber. H_2O 10,35. Gef. H_2O 10,65.

Die trockne Substanz gab folgende Zahlen:

0,0955 g Sbst.: 0,2418 g CO_2, 0,0548 g H_2O. — 0,1259 g Sbst.: 7,75 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

$C_{18}H_{20}O_3N_2$. Ber. C 69,2, H 6,4, N 9,0.

Gef. „ 69,0, „ 6,4, „ 8,6.

Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr schmilzt es gegen 280° (korr. 288°) unter Gelbfärbung; ob es dabei wie die anderen Dipeptide unter Wasserverlust in Phenylalaninanhydrid übergeht, wurde wegen Mangel an Material nicht geprüft. Es löst sich leicht in verdünnten Mineralsäuren und in Alkalien. Die wässerige Lösung nimmt Kupferoxyd mit blauer Farbe auf. Der Geschmack ist schwach bitter.

Cinnamoyl-phenylalanin,

$$C_6H_5.CH : CH.CO.NH.\underset{\textstyle COOH}{\dot{C}H}.CH_2.C_6H_5 \,.$$

Es entsteht in reichlicher Menge bei der Darstellung des oben beschriebenen Dipeptids und geht beim Auskochen des Rohproduktes mit Alkohol in Lösung. Beim Verdampfen des Alkohols hinterbleibt es als kristallinische Masse. Seine Menge ist etwa dreimal so groß wie die-

jenige des Dipeptids. Für die Analyse wurde es aus der 6-fachen Menge heißem Alkohol umgelöst und im Exsikkator getrocknet.

0,1810 g Sbst.: 0,4847 g CO_2, 0,0970 g H_2O. — 0,1891 g Sbst.: 7,9 ccm N (23°, 766 mm).

$C_{18}H_{17}O_3N$. Ber. C 73,2, H 5,8, N 4,7.
Gef. „ 73,0, „ 5,9, „ 4,7.

Es kristallisiert aus Alkohol in mikroskopisch kleinen, sechsseitigen Täfelchen, die bei 194—195° (korr. 198—199°) schmelzen. In Wasser ist es fast unlöslich, desgleichen in verdünnten kalten Säuren. Es löst sich dagegen leicht in heißem Alkohol und Aceton, schwer in Äther und kaltem Benzol. Daß die Verbindung die angenommene Struktur hat, beweist die direkte Synthese aus Phenylalanin und Cinnamoylchlorid.

2 g salzsaures Phenylalanin wurden in 200 ccm Normal-Natronlauge gelöst, auf 0° abgekühlt und dazu abwechselnd in kleinen Portionen unter Schütteln zugegeben 30 ccm abgekühlte Normal-Natronlauge und 3 g Zimmtsäurechlorid, das in dem 4-fachen Volumen Äther gelöst war. Beim Ansäuern schied sich das Cinnamoylphenylalanin nebst Zimmtsäure kristallinisch ab. Letztere ging leicht in den Äther über, und der zurückbleibende Cinnamoylkörper war nach dem Umlösen aus Alkohol rein. Die Ausbeute betrug 90% der Theorie.

Bei dem bisher benutzten Verfahren, Polypeptide aufzubauen, kann die Kette der Aminosäuren nur nach einer Richtung hin verlängert werden. Für die Gewinnung komplizierterer Formen schien es aber sehr erwünscht, die Reihenfolge abzuändern und die Anschiebung neuer Komplexe an dem Carboxyl des Systems vollziehen zu können. Das wird nun möglich durch folgende Reaktion.

Im Gegensatz zu den freien Aminosäuren oder Polypeptiden lassen sich die Derivate, in denen die Aminogruppe durch Einführung eines halogenhaltigen Säureradikals festgelegt ist, durch Chlorphosphor in das entsprechende Säurechlorid verwandeln, und dieses kann dann in gewöhnlicher Weise mit anderen Aminosäuren bzw. deren Estern kombiniert werden. Ausführlicher habe ich die Reaktion studiert bei dem α-Bromisocapronylglycin, dessen Chlorid durch Zusammenbringen mit Glycinester den früher beschriebenen α-Bromisocapronylglycylglycinester[1]) gab. Die große Veränderlichkeit des als Zwischenprodukt dienenden Bromisocapronylglycylchlorids erfordert allerdings bei der Ausführung des Versuches besondere Vorsicht. 3 g fein gepulvertes α-Bromisocapronylglycin wurden mit 20 ccm frisch destillier-

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2988 [1903]. (*S. 332.*)

tem Acetylchlorid übergossen und nach Zusatz von 3 g Phosphorpentachlorid 10—15 Minuten bei gewöhnlicher Temperatur bis zur klaren Lösung geschüttelt. Wird die farblose Flüssigkeit jetzt nach Einwurf eines Siedesteinchens in Eis gekühlt und mit Hilfe einer sehr gut wirkenden Luftpumpe bei etwa 0,3 mm rasch verdampft, so hinterbleibt ein Sirup, der anfangs fast farblos ist und sich zum Schluß bei gewöhnlicher Temperatur schwach gelb färbt. Man löst ihn sofort in reinem trocknem Äther und läßt diese Lösung unter fortwährendem Schütteln in eine ebenfalls trockne, ätherische und stark gekühlte Lösung von überschüssigem Glycinester eintropfen. Dabei entsteht sofort ein weißer, kristallinischer Niederschlag. Zum Schluß wird der überschüssige Glycinester durch trockne gasförmige Salzsäure neutralisiert und der dicke Niederschlag abgesaugt und mit Äther gewaschen. Behandelt man dieses feste Produkt nach dem Abpressen und Verdunsten des Äthers mit Wasser, so geht der salzsaure Glycinester in Lösung, während der α-Bromisocapronylglycylglycinester in fast reinem Zustand zurückbleibt. Seine Menge betrug 1,9 g, und aus der ätherischen Mutterlauge wurden durch Verdunsten noch 0,2 g desselben Produktes erhalten, so daß die Ausbeute mehr als 50% der Theorie erreichte. Einmaliges Umlösen aus verdünntem Alkohol genügte, um ein reines Präparat vom Schmp. 123—124° zu gewinnen.

0,1508 g Sbst.: 0,236 g, CO_2 0,0833 g H_2O.

$C_{12}H_{21}O_4N_2Br$. Ber. C 42,7, H 6,2.

Gef. „ 42,7, „ 6,1.

Aus diesem Produkt läßt sich dann, wie früher gezeigt, das Tripeptid Leucylglycylglycin gewinnen.

Ich habe mich überzeugt, daß das Bromisocapronylglycylglycin auf dieselbe Art in Chlorid verwandelt werden kann, und ich zweifle kaum daran, daß mit der neuen Reaktion eine wertvolle Erweiterung der Polypeptidsynthesen gewonnen ist.

Es ist mir wiederum eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. H. Leuchs für die wertvolle Hilfe, die er auch bei dieser Untersuchung leistete, besten Dank zu sagen.

29. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Synthese von Polypeptiden. V. Derivate des Prolins (α-Pyrrolidin-carbonsäure).

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 37, 3071 (1904).
(Eingegangen am 3. August.)

Von den Aminosäuren, die bisher in den Proteïnen gefunden wurden, ist das Prolin (α-Pyrrolidincarbonsäure) die einzige Iminobase. Da diese Verschiedenheit der Struktur ein Hindernis für die Anwendung der neuen Polypeptidsynthese sein konnte, so haben wir einen darauf bezüglichen Versuch angestellt und uns vom Gegenteil überzeugt. Das Prolin läßt sich nämlich in alkalischer Lösung leicht mit α-Bromisocapronylchlorid vereinigen, und das hierbei entstehende Bromderivat wird durch Behandlung mit Ammoniak ebenso leicht in Leucylprolin, $\frac{CH_3}{CH_3}>CH.CH_2.CH(NH_2).CO.NC_4H_7.COOH$, verwandelt. Letzteres gibt, wie viele andere Dipeptide, beim Erhitzen ein Anhydrid, das ein Analogon des kürzlich beschriebenen Prolylalaninanhydrids[1]) ist.

Das für die nachfolgenden Versuche nötige Prolin haben wir aus Gelatine mit Benutzung der Estermethode bereitet.

Es scheint uns nicht überflüssig, die hierbei gewonnenen Erfahrungen mitzuteilen. Da das Prolin im Gegensatz zu den gewöhnlichen Aminosäuren in heißem Alkohol leicht löslich ist, so läßt es sich auch aus einem komplizierten Gemisch verhältnismäßig leicht isolieren, vorausgesetzt, daß zuvor eine Reinigung durch Destillation der Ester stattgefunden hat. Wir verwandten das Gemisch von Estern, das unter 0,6 mm Druck bei 40—105° (Temperatur des Bades) überdestilliert. Dasselbe wurde durch sechsstündiges Kochen mit der 5-fachen Menge Wasser verseift, die wässerige Lösung bei vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand mit etwa der 5-fachen Menge absolutem Alkohol ausgekocht. Beim Erkalten schied das alkoholische Filtrat einen Niederschlag von anderen Aminosäuren ab, nach deren Entfernung die Lösung

---

[1]) E. Fischer und Umetaro Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 2842 [1904]. (*S. 368.*)

stark eingeengt und darauf mit Äther das Prolin ausgefällt wurde. Die Menge des Rohproduktes betrug 60 g aus 1 kg Gelatine.

Es ist ein Gemisch von aktivem Prolin, racemischem Prolin und anderen gewöhnlichen Aminosäuren, die zwar in reinem Zustand in Alkohol unlöslich sind, aber bei Gegenwart von viel Prolin mit aufgelöst werden. Zur Isolierung des aktiven Prolins haben wir den etwas mühsamen Weg über das Kupfersalz eingeschlagen, der früher ausführlich beschrieben ist[1]). Die Hauptversuche wurden aber mit racemischem Prolin angestellt. Für seine Gewinnung ist es am zweckmäßigsten, das rohe Gemisch der Aminosäuren völlig zu racemisieren.

Zu dem Zwecke wurden 40 g des Gemisches in 150 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 80 g gereinigtem, kristallisiertem Baryumhydroxyd in einem Porzellanbecher 5 Stunden im Autoklaven auf 145° erhitzt. Nach genauer Ausfällung des Baryts mit Schwefelsäure wurde dann die Flüssigkeit unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Hierbei blieben nicht weniger als 6 g ungelöst, die nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser Analysenzahlen gaben, welche auf ein Gemisch von Leucin (bzw. Isoleucin) und Aminovaleriansäure hindeuten.

0,1720 g Sbst.: 0,3374 g CO_2, 0,1483 g H_2O = 53,49% und 9,58% H. — 0,1684 g Sbst.: 16,3 ccm N (20°, 765 mm) = 11,14% N.

$C_6H_{13}NO_2$. Ber. C 54,96, H 9,92, N 10,68.
$C_5H_{11}NO_2$. „ „ 51,28, „ 9,39, „ 11,96.

Die Entfernung dieser Aminosäuren aus dem Rohprolin beruht darauf, daß sie in der racemischen Form sich in Alkohol viel schwerer lösen als in der aktiven[2]).

Zur völligen Reinigung wurde das in der alkoholischen Lösung befindliche racemische Prolin nach dem Verjagen des Alkohols in das schön kristallisierende Kupfersalz verwandelt und daraus durch Ausfällen mit Schwefelwasserstoff wieder regeneriert. Die Ausbeute an reinem Material betrug schließlich 19 g aus 40 g Rohprodukt. Für die nachfolgenden Versuche wurde ausschließlich das reine Präparat benutzt.

---

[1]) E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 164 [1901]. (*S. 644.*)

[2]) Für den qualitativen Nachweis der einfachen Aminosäuren in dem komplizierten Gemisch, das bei der Hydrolyse der Proteïne mit Mineralsäuren entsteht, und in welchem neben den aktiven Produkten immer schon Racemkörper vorhanden sind, ist auch die völlige Racemisierung trotz der dabei eintretenden Verluste ratsam, weil dann die Trennung erheblich leichter wird. Auf diesen Kunstgriff habe ich schon früher bei der Isolierung der Aminovaleriansäure aus Caseïn hingewiesen. (Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 162.) E. Fischer.

α-Bromisocapronyl-prolin (inaktiv).

$(CH_3)_2CH.CH_2.CHBr.CO.NC_4H_7.COOH$.

6 g racemisches Prolin werden in 52,2 ccm Normal-Natronlauge (1 Mol.) gelöst und in einem Gemisch von Salz und Eis gekühlt. Dazu setzt man unter fortwährendem Schütteln abwechselnd in kleinen Portionen im Laufe von etwa $^1/_2$ Stunde 12 g α-Bromisocapronylchlorid (1 Mol.) und 62 ccm Normal-Natronlauge. Übersättigt man jetzt mit Säure, so fällt das α-Bromisocapronylprolin zunächst ölig aus, wird aber nach einiger Zeit zum Teil kristallinisch. Am bequemsten ist die Isolierung durch Ausäthern.

Da das Produkt sich nur in öligem Zustand leicht in Äther löst, so überschichtet man am besten die noch alkalische Flüssigkeit mit ziemlich viel Äther, fügt dann die berechnete Menge Säure (etwa 12 ccm fünffach Normal-Salzsäure) zu und befördert die Ausätherung durch kräftiges Schütteln. Beim Verdunsten des Äthers bleibt ein anfangs öliger Rückstand, der sehr bald zum größten Teil kristallisiert. Nach 12-stündigem Stehen wird die Masse zur Entfernung des ölig gebliebenen Teils mit Petroläther angerieben und scharf abgesaugt. Zur völligen Reinigung löst man die Kristalle in wenig heißem Aceton. Beim Abkühlen scheidet sich der Bromkörper in feinen, farblosen Nädelchen aus. Die Kristallisation kann durch Zusatz von Petroläther vervollständigt werden.

Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 8 g oder 52% der Theorie. Die im Vakuum getrocknete Substanz verliert bei 105° nicht an Gewicht.

0,1853 g Sbst.: 0,3070 g CO_2, 0,1037 g H_2O. — 0,1755 g Sbst.: 7,3 ccm N (18°, 762 mm). — 0,1790 g Sbst.: 0,1170 g AgBr.

$C_{11}H_{18}O_3NBr$.	Ber.	C 45,2,	H 6,2,	N 4,8,	Br 27,4.
	Gef.	„ 45,1,	„ 6,2,	„ 4,8,	„ 27,8.

Das Bromisocapronyl-prolin ist in heißem Aceton und Alkohol leicht löslich, viel schwerer in Äther und Chloroform und fast unlöslich in Petroläther. In kaltem Wasser ist es fast unlöslich, in viel heißem löst es sich auf. Es schmilzt zwischen 159,5° und 163° (korr.) ohne Zersetzung und ist selbstverständlich gänzlich optisch-inaktiv. Ob der wenig scharfe Schmelzpunkt der Substanz, die im übrigen einheitlich aussieht, durch eine geringe Verunreinigung verursacht wird, können wir nicht sagen. Die gleiche Bemerkung gilt für die anderen, in dieser Abhandlung beschriebenen Produkte.

Dem kristallisierten Bromisocapronyl-prolin ist, wie oben erwähnt, anfänglich ein sirupartiges Produkt beigemischt, das durch Waschen mit Petroläther und scharfes Absaugen entfernt wird. Wir vermuten, daß in diesem Sirup eine stereoisomere Verbindung enthalten ist, deren Bildung man theoretisch voraussehen kann.

Da aber ihre Isolierung Schwierigkeiten hat und die Substanz augenblicklich auch kein großes Interesse beanspruchen kann, so haben wir auf die weitere Untersuchung verzichtet.

Ebenso leicht, wie das racemische Prolin, läßt sich seine aktive Form mit dem Bromisocapronylchlorid vereinigen. Wir haben dafür *l*-Prolin verwandt, das mit Hilfe des in Alkohol löslichen Kupfersalzes gereinigt war. Die Darstellung der Bromisocapronylverbindung geschah genau wie oben angegeben. Das Präparat schmolz etwas niedriger alsder Racemkörper, und zwar zwischen 154° und 158° (korr.), und zeigte auch in der äußeren Form eine Verschiedenheit, denn es kristallisierte aus warmem Aceton in mikroskopisch feinen Prismen. Ferner ist es stark aktiv.

0,1223 g Sbst.: 0,2021 g CO_2, 0,0702 g H_2O = 45,06% C und 6,39% H.

Leucyl-prolin (inaktiv), $(CH_3)_2CH.CH_2.\underset{NH_2}{CH}.CO.N\langle\begin{matrix} CH_2.CH_2 \\ CH.CH_2. \\ COOH \end{matrix}$

Löst man Bromisocapronylprolin in der 5-fachen Menge wässerigem Ammoniak, das bei 0° gesättigt ist, und läßt 3 Tage im Eisschranke stehen, so hinterbleibt beim Abdampfen der Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck ein Rückstand, der nur zum Teil kristallisiert. Zur Isolierung des darin enthaltenen Leucylprolins wird mit ziemlich viel Essigester ausgekocht. Schon beim Abkühlen der Lösung pflegt dann das Dipeptid in feinen Nädelchen auszufallen. Den Rest gewinnt man durch passende Konzentration des Filtrates. Zur völligen Beseitigung des anfangs dem Präparat noch anhaftenden Bromammoniums wird es noch ein- bis zweimal aus Essigester umgelöst. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug $^3/_5$ des angewandten Bromkörpers oder 77% der Theorie. Die im Vakuumexsikkator getrocknete Substanz behielt ihr Gewicht im Toluolbade.

0,1782 g Sbst.: 0,3769 g CO_2, 0,1412 g H_2O. — 0,1851 g Sbst.: 19,5 ccm N (20°, 761 mm).

$C_{11}H_{20}O_3N_2$. Ber. C 57,9, H 8,8, N 12,3.
Gef. „ 57,7, „ 8,8, „ 12,1.

Das Leucylprolin kristallisiert aus Essigester in mikroskopisch kleinen, meist zu Büscheln vereinigten Nädelchen, schmilzt zwischen 116° und 119° (korr.) und schmeckt ziemlich stark bitter. Es ist in Wasser und Alkohol leicht löslich, dagegen in Äther sehr schwer löslich.

Von den bisher bekannten Dipeptiden, auch von dem nahe verwandten Prolylalanin[1]), unterscheidet es sich scharf durch sein Ver-

[1]) E. Fischer und Umetaro Suzuki, l. c.

halten gegen Kupferoxyd oder Kupfercarbonat, denn seine wässerige Lösung färbt sich beim Kochen mit diesen Agentien nicht blau. Es scheint also, daß unter diesen Bedingungen kein Kupfersalz entstehen kann. Der Grund für dieses abweichende Verhalten liegt höchstwahrscheinlich darin, daß das zum Carbonyl in α-Stellung befindliche Stickstoffatom tertiär gebunden sind. Wir beabsichtigen, diesen Gesichtspunkt an anderen Beispielen zu prüfen.

Durch zweistündiges Erhitzen mit starker Salzsäure auf dem Wasserbade wird das Leucylprolin völlig in seine Komponenten Leucin und Prolin gespalten, die sich nach Entfernung der Salzsäure leicht durch heißen Alkohol trennen lassen.

Leucyl-prolin-anhydrid,

$$(CH_3)_2CH.CH_2.\underset{\dot{N}H\text{——}CO}{CH.CO.N}\!\begin{array}{l}\diagup CH_2.\dot{C}H_2 \\ \diagdown CH.CH_2\,.\end{array}$$

Wird obiges Dipeptid im Ölbade auf 145° erhitzt, so verliert es unter Blasenwerfen Wasser. Nach 30 Minuten pflegt die Reaktion beendet zu sein, und beim Abkühlen erstarrt die schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit kristallinisch. Das Anhydrid ist in kaltem Wasser schwer löslich und läßt sich aus heißem Wasser sehr leicht in feinen Nädelchen gewinnen, die zwischen 117° und 121° (korr.) schmelzen. Für die Analyse war im Vakuumexsikkator getrocknet. Die wässerige Lösung des Anhydrids färbt sich beim Kochen mit Kupferoxyd ebenfalls nicht blau.

0,1702 g Sbst.: 0,3913 g CO_2, 0,1332 g H_2O.

$C_{11}H_{18}N_2O_2$. Ber. C 62,8, H 8,6.

Gef. „ 62,7, „ 8,7.

Das Anhydrid ist in Aceton leicht löslich, weniger leicht in Alkohol, fast unlöslich in Äther und Petroläther.

30. Hermann Leuchs und Umetaro Suzuki: Synthese von Polypeptiden. VI. Derivate des Phenyl-alanins[1]).

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 37, 3306 (1904).
(Eingegangen am 9. August.)

Bei der weiten Verbreitung des Phenylalanins in Proteïnstoffen schien es von Interesse, seine verschiedenen Polypeptide synthetisch zu bereiten, um sie eventuell mit den Abbauprodukten der Proteïne vergleichen zu können. Einige solcher Produkte, in denen das Radikal des Phenylalanins mit anderen Aminosäuren verkuppelt ist, sind in der vorhergehenden Abhandlung IV[2]) beschrieben. Wir haben umgekehrt nach der bekannten allgemeinen Reaktion das Phenylalanin mit den Radikalen des Glycins, Alanins und Leucins zu Di- und Tripeptiden vereinigt, die nach ihrem ganzen Verhalten den bereits bekannten Polypeptiden gleichen.

Wie in Abhandlung II dargelegt ist, können bei der Synthese von Dipeptiden, die zwei asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten, zwei stereoisomere Racemkörper entstehen. Einen solchen Fall haben wir beobachtet bei dem Leucylphenylalanin. Letzteres entsteht bei der Synthese aus Phenylalanin und Bromcapronylchlorid in zwei isomeren Formen, die sich durch Schmelzpunkt, Löslichkeit, Kristallform unterscheiden und deren Menge sehr verschieden ist.

α-Bromisocapronyl-phenylalanin.

$$(C_4H_9).CHBr.CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}\,.$$

Für die Bereitung dieses Körpers wurden 2 g salzsaures Phenylalanin in 20 ccm Normal-Natronlauge gelöst, auf 0° abgekühlt und unter Schütteln abwechselnd und portionenweise die gleiche Menge Natronlauge und 2,5 g Bromcapronylchlorid, in Äther gelöst, zugefügt. Nachdem dann der Überschuß des Säurechlorids durch Äther entfernt

---

[1]) Die im I. chemischen Institut der Universität Berlin ausgeführten Arbeiten über die synthetischen Polypeptide werden mit fortlaufenden Nummern bezeichnet, damit ihre Zusammengehörigkeit ausgedrückt wird. E. Fischer.

[2]) *S. 369.*

war, wurde angesäuert und das ausgeschiedene Öl in Äther aufgenommen. Beim Verdampfen dieses Lösungsmittels blieb der neue Körper wieder als Öl zurück; bald aber verwandelte er sich in eine Masse feiner, farbloser Kristalle. Eine erste Reinigung, zumal von beigemengter Bromcapronsäure, wurde durch Auswaschen des Rohproduktes mit Petroläther erzielt. Die Ausbeute betrug 3,1 g oder 93% der Theorie, auf Phenylalanin berechnet. Für die Analyse war das Präparat zweimal aus heißem Toluol umkristallisiert und im Exsikkator getrocknet worden.

0,1733 g Sbst.: 0,3353 g CO_2, 0,0924 g H_2O. — 0,1753 g Sbst.: 6,1 ccm N (17°, 765 mm).

		C	H	N
$C_{15}H_{20}NO_3Br$.	Ber.	52,63,	5,85,	4,09.
	Gef.	52,76,	5,93,	4,07.

Die Substanz schmilzt nicht ganz konstant bei 119—123° (korr.). In Alkohol, Äther, Chloroform, Aceton und Essigester ist sie leicht löslich, schwerer in Benzol und Toluol, fast gar nicht in Petroläther. Ihre Lösung in Wasser, das nur sehr wenig davon aufnimmt, reagiert stark sauer. Aus Toluol kristallisiert sie gleichmäßig in mikroskopisch kleinen Kristallen, die aussehen wie doppelte sechsseitige Pyramiden.

Das Bromcapronylphenylalanin macht, abgesehen von dem wenig scharfen Schmelzpunkt, den Eindruck einer einheitlichen Substanz, und es hat sich auch durch die gewöhnlichen Methoden keine Zerlegung erzielen lassen. Daß dasselbe aber doch als ein Gemisch der beiden, durch die Theorie vorausgesehenen, stereoisomeren Formen zu betrachten ist, hat sich bei der Behandlung der Substanz mit Ammoniak gezeigt.

Einwirkung von Ammoniak auf das α-Bromisocapronyl-phenylalanin.

20 g des Bromkörprs wurden mit 100 ccm wässerigem Ammoniak eine Stunde im Rohr auf 100° erhitzt. Die farblose Lösung wurde auf dem Wasserbade verdampft, zuletzt unter Zusatz von Alkohol, um Wasser und Ammoniak möglichst zu entfernen. Der feste Rückstand ließ sich durch Auskochen mit absolutem Alkohol von Bromammonium befreien, wobei das amidierte Produkt als in Alkohol fast unlösliche, kristallinische Masse zurückblieb. Seine Menge betrug 10,5 g, was etwa 60% der Theorie entspricht. Der Schmelzpunkt der Rohsubstanz lag bei 230°.

Als wir dieselbe nun zwecks weiterer Reinigung mit viel 50-prozentigem Alkohol auskochten, zeigte es sich, daß ein Teil derselben, nämlich 1,5 g, nicht in Lösung ging, sowie daß der Schmelzpunkt des

Ungelösten auf 260⁰ gestiegen, während derjenige des im verdünnten Alkohol enthaltenen Anteiles auf 220⁰ heruntergegangen war.

Die weitere Untersuchung hat ergeben, daß die beiden so verschiedenen Fraktionen die Zusammensetzung des Leucylphenylalanins haben, daß es sich hier also nur um die beiden möglichen Stereoisomeren handeln kann.

Das in größerer Menge entstehende Dipeptid soll zuerst beschrieben werden, und zwar unter der Bezeichnung:

α-Leucyl-phenylalanin,

$$(C_4H_9)(NH_2)CHCO.NH.CH\left\langle\begin{matrix}CO_2H\\ CH_2.C_6H_5\end{matrix}\right. .$$

Aus der obenerwähnten Lösung schieden sich beim Erkalten 8 g des α-Produktes in winzigen, schief abgeschnittenen Prismen ab, die zur weiteren Reinigung noch einmal aus verdünntem Alkohol umgelöst und für die Analyse über Schwefelsäure getrocknet waren. Beim Erhitzen auf 105—110⁰ verlor die Substanz ein Molekül Kristallwasser.

0,3453 g Sbst.: 0,0196 g H_2O.

$C_{15}H_{22}N_2O_3.H_2O$. Ber. H_2O 6,08. Gef. H_2O 5,71.

Das wasserfreie Präparat gab folgende Zahlen:

0,1377 g Sbst.: 0,3268 g CO_2, 0,0970 g H_2O. — 0,1743 g Sbst.: 15,5 ccm N (19⁰, 763 mm).

$C_{15}H_{22}N_2O_3$. Ber. C 64,75, H 7,91, N 10,07.
Gef. „ 64,72, „ 7,83, „ 10,36.

Das α-Leucyl-phenylalanin schmilzt, gleichgültig, ob kristallwasserhaltig oder trocken, bei 220—223⁰ (korr.) nach kurzem Aufschäumen zu einem farblosen Öl. Es ist in kaltem Wasser schwer, leicht in heißem löslich, in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln so gut wie unlöslich. Leicht wird es von Säuren und Alkalien aufgenommen. Seine wässerige Lösung reagiert sauer gegen Lakmus und schmeckt schwach bitter. Dieselbe löst Kupferoxyd unter Bildung eines tiefblauen leicht löslichen Salzes; mit Phosphorwolframsäure gibt sie in schwach saurer Lösung eine voluminöse Fällung, die sich aber sowohl beim Erwärmen wie in größerem Überschuß von Mineralsäuren wieder auflöst.

β-Leucyl-phenylalanin.

Da diese Form des Dipeptides, welche bei der Trennung des rohen Gemisches ungelöst bleibt, auch in heißem Wasser sehr schwer löslich ist, so wurde das Präparat zu seiner Reinigung in Normal-Natronlauge

gelöst und durch Zugabe der äquivalenten Säuremenge wieder abgeschieden.

Für die Analyse war es über Schwefelsäure getrocknet; es ist dann, im Gegensatz zu dem α-Dipeptid, kristallwasserfrei.

0,1868 g Sbst.: 0,4423 g CO_2, 0,1322 g H_2O. — 0,1690 g Sbst.: 14,2 ccm N (17°, 776 mm).

$C_{15}H_{22}N_2O_3$. Ber. C 64,76, H 7,91, N 10,07.
Gef. „ 64,58, „ 7,87, „ 9,94.

Das Präparat schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 259° (korr.) unter Gasentwickelung und Bräunung. Es kristallisiert aus Wasser in mikroskopisch kleinen Kristallkörnern, bestimmte Formen sind nicht zu erkennen; die wässerige Lösung färbt sich beim Kochen mit Kupferoxyd tiefblau. Phosphorwolframsäure gibt eine reichliche Fällung, die sich beim Erwärmen oder im Überschuß des Fällungsmittels wieder löst.

Zur weiteren Charakteristik der beiden Dipeptide haben wir ihre Verbindungen mit Phenylisocyanat hergestellt und auch bei ihrer Vergleichung eine Verschiedenheit in wichtigen Eigenschaften konstatiert.

Phenylisocyanat-α-leucylphenylalanin.

$$C_6H_5.NH.CO.NH.CH(C_4H_9)CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}.$$

1 g α-Leucylphenylalanin wurde in 3,8 ccm *n*-Natronlauge aufgelöst und bei 0° 0,45 g Phenylisocyanat tropfenweise unter Schütteln zugegeben. Nach dem Verschwinden des Isocyanatgeruches wurde angesäuert, wobei ein anfangs zähflüssiger, bald fest werdender Niederschlag ausfiel. Seine Menge belief sich auf 1,2 g oder 90% der Theorie. Zweimaliges Lösen in möglichst wenig Essigester und Abscheidung durch Zugabe des doppelten Volumens Petroläther genügte, um die Substanz analysenrein zu machen. Über Schwefelsäure getrocknet, gab sie folgende Zahlen.

0,1856 g Sbst.: 0,4505 g CO_2, 0,1147 g H_2O. — 0,1456 g Sbst.: 12,7 ccm N (17°, 780 mm).

$C_{22}H_{27}N_3O_4$. Ber. C 66,50, H 6,80, N 10,58.
Gef. „ 66,19, „ 6,87, „ 10,35.

Das Ureïd schmilzt bei 193—195° (korr.) unter Zersetzung; es ist in Wasser sehr schwer löslich, leicht in Alkohol, Äther, Essigester und Aceton, etwas schwerer in Benzol und Chloroform, fast unlöslich in Petroläther; es kristallisiert in sechsseitigen, anscheinend rhombischen Tafeln.

Phenylisocyanat-β-leucylphenylalanin.

Die Darstellung und Isolierung dieser Verbindung erfolgten genau so, wie es oben für die isomere Form angegeben ist. Auch hier wurde das Rohprodukt, das in einer Menge von 90% der Theorie entstanden war, zweimal in Essigester, worin es etwas schwerer löslich ist, gelöst und durch Petroläther ausgefällt. Es kristallisierte so in mikroskopisch kleinen Nadeln. Der konstant bleibende Schmelz- bzw. Zersetzungspunkt lag bei 183—184° (korr.), also etwa 10° niedriger als bei dem Isomeren. Sonstige merkliche Verschiedenheiten in den Lösungsverhältnissen waren nicht zu beobachten.

Für die Analyse war über Schwefelsäure getrocknet:

0,1180 g Sbst.: 0,2874 g CO_2, 0,0714 g H_2O. — 0,1282 g Sbst.: 11,8 ccm N (22°, 770 mm).

$C_{22}H_{27}N_3O_4$. Ber. C 66,50, H 6,80, N 10,58.
Gef. „ 66,43, „ 6,72, „ 10,57.

Vom Leucylphenylalanin haben wir noch einige Derivate hergestellt, nämlich den salzsauren Äthylester, die Carbäthoxylverbindung und die Kombination mit α-Bromcapronsäure, die wir für die Synthese des Leucyl-α-leucylphenylalanins benötigten.

Salzsaurer Leucyl-phenylalanin-äthylester,

$$HCl.NH_2.CH(C_4H_9)CO.NH.CH\langle{}^{CO_2C_2H_5}_{CH_2.C_6H_5}.$$

Zu seiner Bereitung wurde 1 g des α-Körpers mit 10 ccm alkoholischer Salzsäure eine Minute lang erwärmt, wobei er sich klar auflöste. Als dann die Lösung über Kali und Schwefelsäure in vacuo stark eingeengt wurde, schied sich in guter Ausbeute das salzsaure Salz ab.

Das Hydrochlorat ist leicht löslich in Wasser, in organischen Lösungsmitteln ist es schwer oder unlöslich. Es kann aus wenig heißem Alkohol umgelöst werden, und zwar scheidet es sich daraus in Form mikroskopisch kleiner, 4-seitiger Tafeln ab. Ein so gereinigtes Präparat schmolz bei 193—195° (korr.) unter Zersetzung; dasselbe wurde analysiert.

0,1724 g Sbst.: 0,3755 g CO_2, 0,1151 g H_2O. — 0,1911 g Sbst.: 12,6 ccm N (9°, 777 mm).

$C_{17}H_{26}N_2O_3.HCl$. Ber. C 59,59, H 7,59, N 8,17.
Gef. „ 59,40, „ 7,42, „ 8,12.

Carbäthoxyl-α-leucylphenylalanin,

$$(CO_2C_2H_5)NHCH(C_4H_9)CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2C_6H_5}.$$

Die Aminoverbindung wurde in der gewöhnlichen Weise mit chlorkohlensaurem Äthyl zur Reaktion gebracht. Man erhält so eine wässerige Lösung des Natriumsalzes des gewünschten Derivates. Es wurde angesäuert, die halbfeste Ausscheidung in Äther aufgenommen und derselbe verdampft, wobei farblose Kristalle in guter Ausbeute zurückblieben. Für die Analyse waren diese zweimal aus wenig heißem Benzol umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet worden.

0,1243 g Sbst.: 0,2805 g CO_2, 0,0799 g H_2O. — 0,1703 g Sbst.: 10,8 ccm N (13°, 781 mm).

$C_{18}H_{26}N_2O_5$. Ber. C 61,72, H 7,43, N 8,00.
Gef. „ 61,54, „ 7,14, „ 7,72.

Das Präparat schmilzt bei 140—141,5° (korr.); es ist leicht löslich in Alkohol, Äther, schwerer in Benzol, in Petroläther fast unlöslich, ebenso in kaltem Wasser; es kristallisiert in winzigen Nadeln.

α-Bromisocapronyl-α-leucylphenylalanin,

$$(C_4H_9)CHBrCO.NHCH(C_4H_9)CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}.$$

Das Leucylphenylalanin wurde wie sonst mit dem Bromcapronylrest kombiniert, das gebildete Produkt durch Äther isoliert. Nach dem Verdunsten dieses Lösungsmittels hinterblieb zunächst ein Sirup, der durch Verreiben mit Petroläther fest wurde.

Die Ausbeute belief sich auf 65% der Theorie.

Für die Analyse war der rohe Bromkörper zweimal aus heißem Benzol umgelöst worden.

0,1761 g Sbst.: 0,3593 g CO_2, 0,1081 g H_2O. — 0,1825 g Sbst.: 9,5 ccm N (12°, 773 mm).

$C_{21}H_{31}N_2O_4Br$. Ber. C 55,39, H 6,81, N 6,15.
Gef. „ 55,65, „ 6,82, „ 6,28.

Die Substanz schmilzt bei 163—165° (korr.); aus Benzol kristallisiert sie in farblosen Nadeln; in Chloroform ist sie leicht und successive schwerer löslich in Äther, Alkohol, Benzol, Wasser und Petroläther.

Leucyl-α-leucylphenylalanin,

$$NH_2CH(C_4H_9)CO.NHCH(C_4H_9)CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}.$$

In einer Ausbeute von etwa 50% der Theorie haben wir dieses Tripeptid erhalten, indem wir den vorigen Bromkörper mit überschüssigem, wässerigem Ammoniak 1 Stunde lang auf 100° erhitzten, das

Ammoniak und Wasser verdampften und den Rückstand durch Alkohol von Ammoniumbromid befreiten.

Für die Analyse diente uns ein aus 80-prozentigem, heißem Alkohol umgelöstes Präparat; im Exsikkator getrocknet, enthält es noch 2 Moleküle Kristallwasser.

0,0925 g Sbst.: 0,1991 g CO_2, 0,0735 g H_2O. — 0,1490 g Sbst.: 13,4 ccm N (22°, 759 mm).

$C_{21}H_{33}N_3O_4 . 2\,H_2O$. Ber. C 59,02, H 8,66, N 9,84.
Gef. „ 58,70, „ 8,83, „ 10,17.

Das Tripeptid schmilzt bei 225—227° (korr.) zu einem farblosen Öl. Seine Lösung in Wasser, worin es in der Kälte schwer, in der Wärme leicht löslich ist, reagiert gegen Lakmus ziemlich stark sauer; sie löst Kupferoxyd unter kräftiger Blaufärbung, auf Zusatz von Natronlauge geht die Farbe in blauviolett über. Phosphorwolframsäure gibt eine starke Fällung, die sich in der Hitze wie im Überschuß des Fällungsmittels wieder löst.

Etwas löslich ist die Substanz auch in warmem Chloroform.

α-Brompropionyl-phenylalanin,

$$CH_3.CHBr.CO.NH.CH\Big\langle{CO_2H \atop CH_2.C_6H_5}.$$

2 g salzsaures Phenylalanin wurden in 30 ccm Normal-Natronlauge gelöst, auf 0° abgekühlt und unter Schütteln 3 g Brompropionylbromid (ohne Lösungsmittel) und 15 ccm Normallauge abwechselnd zugegeben. Diese Mengen entsprechen einem Verhältnisse von 1 Mol. salzsaurem Phenylalanin zu 1,5 Mol. Bromid zu 4,5 Mol. Alkali.

Dann wurde die erforderliche Säuremenge zugefügt und ausgeäthert. Der nach dem Verjagen des Äthers resultierende Sirup wurde durch Waschen mit Wasser von Brompropionsäure befreit und so zur Kristallisation gebracht. Die Ausbeute war gleich 70% der Theorie. Die zweimal aus Benzol umgelösten, farblosen Nadeln schmolzen konstant bei 132—133° (korr.); sie wurden analysiert.

0,1780 g Sbst.: 0,3146 g CO_2, 0,0771 g H_2O. — 0,1913 g Sbst.: 7,5 ccm N (19°, 755 mm).

$C_{12}H_{14}NO_3Br$. Ber. C 48,00, H 4,67, N 4,67.
Gef. „ 48,20, „ 4,81, „ 4,48.

Brompropionylphenylalanin ist in kaltem Wasser schwer, in heißem leicht löslich, sehr leicht auch in organischen Solventien, Petroläther ausgenommen.

Es diente uns für die Synthese des

Alanyl-phenylalanins, $(CH_3)(NH_2)CHCO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}$.

Darstellung und Isolierung dieses Körpers unterscheiden sich in nichts von der der anderen Polypeptide.

Die Ausbeute betrug 68% der berechneten.

Das Dipeptid ist leicht löslich in Wasser; es wird daraus durch Alkohol in Form äußerst dünner, gerade abgeschnittener Prismen abgeschieden.

Ein Präparat, das so behandelt und über Schwefelsäure getrocknet war, verlor beim Erhitzen auf 105—110° zwei Moleküle Kristallwasser.

0,1197 g Sbst.: 0,0160 g H_2O. — 0,1700 g Sbst.: 0,3310 g CO_2, 0,1165 g H_2O.

$C_{12}H_{16}N_2O_3.2\,H_2O$.	Ber.	C 52,94,	H 7,35,	N 10,29,	H_2O 13,24.
	Gef.	„ 53,10,	„ 7,61,	„ 10,18,	„ 13,37.

Das Alanylphenylalanin schmilzt unter Gasentwickelung bei 241 bis 243° (korr.); es bildet ein leicht lösliches Kupfersalz; durch Phosphorwolframsäure wird es aus seiner Lösung nicht niedergeschlagen.

Chloracetylphenylalanin, $ClCH_2.CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}$.

Das Phenylalanin wurde durch Schütteln seiner alkalischen Lösung mit einer ätherischen Lösung von Chloracetylchlorid bei 0° in das gewünschte Derivat verwandelt.

Die gewählten Verhältnisse waren:

1 Mol. Phenylalanin, 1 Mol. Chlorid, $2^1/_2$ Mol. Natronlauge. Beim Ansäuern schied sich der Körper nicht ab; er konnte jedoch durch Ausäthern und Verdampfen des Äthers als ein Sirup gewonnen werden, der durch Verreiben mit Petroläther bald kristallinisch erstarrte. Die Ausbeute betrug 92% der Theorie.

Für die Analyse war aus heißem Benzol umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet worden.

0,1851 g Sbst.: 0,3725 g CO_2, 0,0825 g H_2O. — 0,2103 g Sbst.: 9,7 ccm N (17°, 780 mm).

$C_{11}H_{12}NO_3Cl$.	Ber.	C 54,68,	H 4,97,	N 5,80.
	Gef.	„ 54,89,	„ 4,96,	„ 5,67.

Chloracetylphenylalanin schmilzt bei 130—131° (korr.). Es reagiert stark sauer. In Chloroform, Aceton, Essigester, Alkohol ist es leicht, etwas schwerer in Benzol, Toluol, Äther, gar nicht in Petroläther löslich. Leicht wird es von heißem Wasser aufgenommen und kristallisiert daraus beim Erkalten in schiefen, vierseitigen Tafeln.

Bei einstündigem Erhitzen mit Ammoniak auf 100° wurde daraus das

Glycylphenylalanin, $NH_2CH_2CO.NH.CH\langle^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}$,

erhalten, dessen Isolierung in normaler Weise erfolgte. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 90% der Theorie. Zur Reinigung wurde dasselbe in wenig heißem Wasser gelöst und durch Zugabe der 3-fachen Menge Alkohol in Form winziger, wetzsteinartiger Kristalle wieder abgeschieden.

Ein über Schwefelsäure getrocknetes Präparat gab folgende Zahlen:

0,1611 g Sbst.: 0,3495 g CO_2, 0,0903 g H_2O. — 0,1796 g Sbst.: 18,8 ccm N (16°, 771 mm).

$C_{11}H_{14}N_2O_4$. Ber. C 59,46, H 6,31, N 12,61.
Gef. „ 59,17, „ 6,23, „ 12,38.

Glycylphenylalanin schmilzt beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 270° (korr.) unter völliger Zersetzung, nachdem es sich schon von 255° an braun gefärbt hat. In den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln ist es kaum löslich, leicht dagegen in Wasser. Diese Lösung gibt beim Kochen mit Kupferoxyd ein leicht lösliches, tiefblaues Salz; durch Phosphorwolframsäure entsteht keine Fällung.

α-Bromisocapronylglycylphenylalanin,

$(C_4H_9)CHBrCO.NHCH_2CO.NH.CH\langle^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}$.

2 g Glycylphenylalanin wurden in 27 ccm Normal-Natronlauge (3 Mol.) gelöst und unter starkem Schütteln nach und nach 1 Mol.-Gew. Bromcapronylchlorid mit Äther verdünnt zugegeben. Als dann mit Säure übersättigt wurde, schied sich der neue Körper ölförmig aus. Obgleich derselbe, wenn rein und kristallisiert, kaum in Äther löslich ist, ließ er sich in der vorliegenden Form durch dieses Lösungsmittel extrahieren, schied sich aber alsbald in feinen Nadeln wieder daraus ab. Die Ausbeute betrug 45% der Theorie. Für die Analyse war aus verdünntem Alkohol umgelöst und in vacuo über Schwefelsäure getrocknet.

0,1817 g Sbst.: 0,3430 g CO_2, 0,0968 g H_2O. — 0,1843 g Sbst.: 11,3 ccm N (20°, 745 mm).

$C_{17}H_{23}N_2O_4Br$. Ber. C 51,13, H 5,76, N 7,02.
Gef. „ 51,48, „ 5,87, „ 6,88.

Das Präparat schmilzt bei 163—164° (korr.). Es ist nicht löslich in Benzol, Petroläther und Wasser, leicht in Aceton und Alkohol.

Leucylglycylphenylalanin,

$$NH_2(C_4H_9)CHCO.NHCH_2CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}.$$

Aus dem oben beschriebenen Bromkörper wurde durch Einwirkung von wässerigem Ammoniak bei 100° das Tripeptid dargestellt und in der gewöhnlichen Weise in einer Menge von 60% der berechneten isoliert. Das Rohprodukt wurde aus heißem Wasser umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1203 g Sbst.: 0,2671 g CO_2, 0,0810 g H_2O. — 0,175 g Sbst.: 19,1 ccm N (19°, 747 mm).

$C_{17}H_{25}N_3O_4$. Ber. C 60,89, H 7,46, N 12,54.
Gef. „ 60,56, „ 7,48, „ 12,33.

Das Präparat schmilzt bei 225—228° (korr.) unter Gasentwickelung. In kaltem Wasser ist es schwer, leichter in heißem löslich. Es scheidet sich daraus als kristallinisches Pulver ab; bestimmte Formen sind nicht zu erkennen.

Die wässerige Lösung wird durch Phosphorwolframsäure gefällt; mit Kupfersalzen und Natronlauge gibt sie eine blauviolette Färbung.

Chloracetylglycylphenylalanin,

$$ClCH_2.CO.NHCH_2CO.NH.CH\langle{}^{CO_2H}_{CH_2.C_6H_5}.$$

1 g Glycylphenylalanin, gelöst in 14 ccm Normal-Natronlauge (3 Mol.), wurde bei 0° etwa $^1/_4$ Stunde lang mit 0,8 g Chloracetylchlorid (1,5 Mol.) geschüttelt, dann die nötige Menge Salzsäure zugegeben. Auch hier ließ sich der harzig ausfallende Körper leicht durch Äther extrahieren, während er bald aus der ätherischen Lösung auskristallisierte. Die Ausbeute war 0,9 g oder $^2/_3$ der Theorie.

Für die Analyse war zweimal aus heißem Wasser umgelöst worden.

0,1002 g Sbst.: 0,1927 g CO_2, 0,0460 g H_2O. — 0,1278 g Sbst.: 10,2 ccm N (17°, 771 mm).

$C_{13}H_{15}N_2O_4Cl$. Ber. C 52,28, H 5,03, N 9,38.
Gef. „ 52,45, „ 5,10, „ 9,46.

Die Substanz schmilzt bei 151—152° (korr.). Sie ist in Aceton und Alkohol leicht löslich, wenig in Wasser, nicht in Benzol. Sie kristallisiert in Nadeln.

Diglycylphenylalanin,

$$NH_2CH_2CO.NHCH_2CO.NH.CH(CH_2.C_6H_5)CO_2H.$$

2 g Chloracetylglycylphenylalanin wurden mit 10 ccm wässerigem Ammoniak 1 Stunde auf 100° erhitzt, dann verdampft und das Reaktionsgemisch durch Alkohol von Chlorammonium befreit. Die Aus-

beute an Rohsubstanz betrug 60% der Theorie. Das Präparat wurde aus verdünntem Alkohol umgelöst. Nach dem Trocknen im Exsikkator über Schwefelsäure gab es folgende Zahlen:

0,1610 g Sbst.: 0,3284 g CO_2, 0,0891 g H_2O. — 0,1863 g Sbst.: 23,9 ccm N (17°, 768 mm).

$C_{13}H_{17}N_3O_4$. Ber. C 55,91, H 6,10, N 15,05.
Gef. „ 55,63, „ 6,15, „ 15,05.

Das Tripeptid schmilzt bei 238—239° (korr.) unter Gasentwickelung. Es ist leicht löslich in heißem, schwerer in kaltem Wasser. Es kristallisiert in langen Nadeln.

Seine wässerige Lösung gibt mit Phosphorwolframsäure und wenig Mineralsäure einen voluminösen Niederschlag, der sich in der Hitze und im Überschuß des Fällungsmittels wieder löst. Mit Kupfersalzen und Natronlauge gibt sie blauviolette Färbung.

---

31. Emil Fischer und Umetaro Suzuki: Synthese von Polypeptiden. VII. Derivate des Cystins.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 37, 4575 (1904).
(Eingegangen am 15. November.)

Nach den schönen Untersuchungen von K. A. H. Mörner[1]) ist das Cystin ein regelmäßiger Bestandteil der schwefelhaltigen Proteïnstoffe, und da seine Menge in einzelnen Fällen bis fast zu 12% des Gesamtgewichts ansteigt, so spielt es auch in dem Molekül keineswegs eine untergeordnete Rolle. Es schien deshalb von Interesse, polypeptidartige Kombinationen dieser geschwefelten Base mit anderen Aminosäuren herzustellen, weil derartige Produkte aller Wahrscheinlichkeit nach beim successiven Auf- und Abbau der Proteïne gebildet werden. In alkalischer Lösung läßt sich das Cystin in der Tat leicht mit halogenhaltigen Säurechloriden vereinigen und nimmt davon zwei Moleküle auf. Wir haben die Versuche mit Chloracetylchlorid, Brompropionylbromid und α-Bromisocapronylchlorid ausgeführt und in allen Fällen kristallinische Produkte erhalten. Durch Behandlung mit Ammoniak entstehen daraus die entsprechenden Polypeptide, das Diglycyl-, Dialanyl- und Dileucylcystin. Die schönsten Eigenschaften von ihnen besitzt das Alaninderivat, das aus Wasser kristallisiert, während die beiden anderen Kombinationen nur in amorphem Zustand gewonnen wurden. Das von uns benutzte Cystin war aus Roßhaar durch Kochen mit Salzsäure gewonnen und derart gereinigt, daß wir annehmen können, die reine, optisch-aktive Base verarbeitet zu haben. Infolgedessen sind auch alle von uns dargestellten Derivate optisch-aktiv. Ihre Stereochemie verdient eine besondere Betrachtung, weil sie nicht allein komplizierter ist, als bei den bisher bekannten Polypeptiden, sondern auch einen besonderen Fall darbietet, der unseres Wissens noch niemals, theoretisch oder praktisch behandelt worden ist. Das Cystin, $COOH.\underset{*}{C}H(NH_2).CH_2S.S.CH_2.\underset{*}{C}H(NH_2).COOH$, gleicht stereochemisch der aktiven Weinsäure; es besteht aus 2 gleichen Hälften mit je einem

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. 34, 207 [1901].

durch Sternchen markierten asymmetrischen Kohlenstoffatom, und es ist deshalb gleichgültig, an welcher Aminogruppe Substitution eintritt. Kombiniert man nun Cystin mit zwei Molekülen eines racemischen Säurechlorids, wie α-Brompropionylchlorid, so können drei isomere, optisch-aktive Produkte entstehen. Werden die beiden Stereoisomeren des Säurechlorids mit *d* und *l* bezeichnet, so hat man für das Dibrompropionylcystin die drei Formen *d d*, *l l* und *d l*. In welchem Mengenverhältnisse diese drei Produkte gebildet werden, läßt sich theoretisch nicht voraussehen; so viel aber kann man nach den bisherigen Erfahrungen sagen, daß die beiden Kombinationen *d d* und *l l* wahrscheinlich annähernd in gleicher Quantität resultieren werden, während die Kombination *d l* unabhängig von den anderen ist und deshalb auch das einzige Produkt der Reaktion sein kann. In Wirklichkeit haben wir nun das Dibrompropionylcystin:

$$\begin{array}{l} CH_3.\underset{\dot{}}{CH}.CO.NH.\underset{\dot{}}{CH}.CH_2.S.S.CH_2.\underset{\dot{}}{CH}.NH.CO.\underset{\dot{}}{CH}.CH_3 \\ \quad\;\; Br \qquad\qquad\quad COOH \qquad\qquad\qquad\quad COOH \qquad\quad Br \end{array}$$

als ein Produkt, das dem Anschein nach einheitlich ist, in einer Ausbeute von 71% der Theorie erhalten. Sollte die genauere Untersuchung die Homogenität des Produkts bestätigen, so müßte man aus der Ausbeute den Schluß ziehen, daß es nur die *d l*-Verbindung sein kann. Jedenfalls ersieht man aus der Betrachtung, daß der Aufbau der Polypeptide eine treffliche Gelegenheit für die Prüfung neuer stereochemischer Probleme darbietet.

Di-chloracetyl-cystin,

$$\begin{array}{l} CH_2.CO.NH.\underset{\dot{}}{CH}.CH_2.S.S.CH_2.\underset{\dot{}}{CH}.NH.CO.CH_2 \\ Cl \qquad\qquad\quad COOH \qquad\qquad\qquad\quad COOH \qquad\quad Cl \end{array}.$$

2 g Cystin werden in 30 ccm Normal-Natronlauge gelöst und dazu bei gewöhnlicher Temperatur unter kräftigem Schütteln in kleinen Portionen abwechselnd 2,3 g Chloracetylchlorid (2,4 Mol.) und 20 ccm Normal-Natronlauge im Laufe von etwa 20 Minuten zugefügt. Die Flüssigkeit erwärmt sich dabei schwach und färbt sich gelblich. Sie wird dann mit 35 ccm Normal-Salzsäure versetzt und 5—6 mal ausgeäthert. Die ätherische Lösung enthält den größten Teil des Chloracetylcystins. Will man den in der wässerigen Flüssigkeit zurückgebliebenen Rest noch gewinnen, so verdampft man bei sehr niederem Druck bis fast zur Trockne und extrahiert mit Essigäther. Der ätherische Auszug wird nach dem Trocknen mit Natriumsulfat verdampft; dabei bleibt ein Sirup, der sich nach völliger Entfernung des Äthers im Vakuumexsikkator beim Verreiben mit Petroläther in einen

dicken Kristallbrei verwandelt. Der Essigätherauszug verhält sich ebenso.

Die Ausbeute an kristallinischem Produkt schwankte und betrug im besten Fall 61% der Theorie. Zur Reinigung des Rohprodukts, das kleine Mengen Chloressigsäure enthält, löst man in wenig Essigäther und fällt mit einem Gemisch von Äther und Petroläther. Wird diese Operation wiederholt, so bleibt der Schmelzpunkt der Kristalle konstant. Für die Analyse wurde im Vakuumexsikkator getrocknet.

0,1725 g Sbst.: 0,1937 g CO_2, 0,0518 g H_2O. — 0,1740 g Sbst.: 10,7 ccm N (19⁰, 757 mm).

$C_{10}H_{14}N_2S_2O_6Cl_2$. Ber. C 30,53, H 3,56, N 7,13.
Gef. „ 30,63, „ 3,34, „ 7,11.

Beim langsamen Kristallisieren bildet die Substanz farblose, mikroskopische kleine Prismen oder Tafeln, die bei 134,5—136,5⁰ (korr.) zu einem farblosen Öl schmelzen. Sie löst sich in Wasser, Alkohol, Essigäther und Aceton sehr leicht, in Äther dagegen schwer und in Petroläther fast gar nicht.

Diglycyl-cystin, $\underset{NH_2}{CH_2}CO.NH\underset{COOH}{CH}CH_2S.S.CH_2.\underset{COOH}{CH}NH.CO\underset{NH_2}{CH_2}$.

Erwärmt man 2 g Dichloracetylcystin mit 10 ccm Ammoniak von 25% im geschlossenen Gefäß eine Stunde auf 70⁰, so ist alles Halogen abgespalten und die Flüssigkeit schwach bräunlich gefärbt. Da sie sich bei Zutritt der Luft in der Wärme rot färbt, so wird sie im Vakuum zum Sirup verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst und zur Entfernung des Bromammoniums mit fein gepulvertem Silbersulfat geschüttelt. Nachdem aus dem Filtrat überschüssiges Silber und Schwefelsäure in bekannter Weise durch Baryt entfernt sind, wird die klare Lösung weiter im Vakuum stark konzentriert und schließlich mit absolutem Alkohol versetzt. Dadurch wird das Polypeptid als weiße, amorphe Masse gefällt. Man wäscht mit Alkohol und Äther, löst dann in wenig Wasser, klärt mit etwas Tierkohle und läßt im Vakuumexsikkator langsam verdunsten. Dabei scheidet sich das Polypeptid als farblose, durchsichtige, harte Masse ab, die beim Reiben ein weißes Pulver gibt. Leider ist die Kristallisation des Präparates bis jetzt nicht gelungen. Die Ausbeute betrug etwa 60% der Theorie.

Für die Analyse war im Vakuum bei 80⁰ getrocknet.

0,1825 g Sbst.: 0,2251 g CO_2, 0,0852 g H_2O. — 0,1755 g Sbst.: 23,7 ccm N (19⁰, 766 mm).

$C_{10}H_{18}N_4S_2O_6$. Ber. C 33,90, H 5,08, N 15,82.
Gef. „ 33,64, „ 5,19, „ 15,64.

Das Diglycylcystin ist in Wasser leicht, in Alkohol, Äther, Chloroform, Petroläther, Benzol, Aceton, Essigäther schwer löslich. Es reagiert mit Lakmus sauer und hat keinen konstanten Schmelzpunkt. Es löst Kupferoxyd in wässeriger Lösung beim Kochen mit blauer Farbe.

Di-Brompropionyl-cystin.

Die Darstellung ist dieselbe wie beim Chloracetylderivat, nur verwendet man auf 2 g Cystin 5 g α-Brompropionylbromid (2,4 Mol.). Das Dibrompropionylcystin wird der angesäuerten Lösung durch wiederholtes Ausäthern völlig entzogen. Wird die ätherische Lösung nach dem Trocknen mit Natriumsulfat verdampft, so bleibt es als Sirup zurück, der sich aber auf Zusatz von absolutem Äther bald in schöne, farblose Nadeln verwandelt. Auch hier schwankt die Ausbeute, sie betrug im besten Fall an sorgfältig getrockneter Substanz 71% der Theorie.

Zur Reinigung wird das Produkt in Essigäther gelöst und durch Äther wieder abgeschieden. Die schönen Nadeln, die so erhalten werden, sind eine lockere Verbindung des Dibrompropionylcystins mit Äther. Sie verwittern schon beim Liegen an der Luft und verwandeln sich in ein lockeres, weißes Pulver.

Für die Analyse war nochmal in derselben Weise umkristallisiert und zur Verjagung des Äthers zuerst im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur und später bei 80° mehrere Stunden bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

0,1711 g Sbst.: 0,1789 g CO_2, 0,0565 g H_2O. — 0,1831 g Sbst.: 8,3 ccm N (18°, 762 mm). — 0,2392 g Sbst.: 0,2108 g $BaSO_4$.

$C_{12}H_{18}N_2S_2O_6Br_2$. Ber. C 28,24, H 3,53, N 5,49, S 12,55.
Gef. „ 28,52, „ 3,67, „ 5,25, „ 12,12.

Die Verbindung scheidet sich aus der konzentrierten Lösung in Essigäther auf Zusatz von viel Äther in langen, schönen Nadeln ab. Diese enthalten, wie oben erwähnt, Äther und sintern deshalb bereits gegen 60°. Sie verwittern schon beim Liegen an der Luft. Zur völligen Austreibung des Äthers ist aber ziemlich langes Erhitzen nötig, wie oben bei dem analysierten Präparate angegeben wurde. Die scharf getrocknete Substanz schmilzt im Kapillarrohr bei 145,5—146,5° (korr.) zu einem schwach braunen Öl, welches sich bald nachher unter Aufschäumen gänzlich zersetzt. In kaltem Wasser ist sie schwer löslich; beim Kochen damit schmilzt sie und löst sich in reichlicher Menge. In Alkohol, Aceton und Essigäther ist sie leicht, in Äther, Benzol, Petroläther aber viel schwerer löslich.

Dialanyl-cystin,

$$\underset{\textstyle NH_2}{CH_3.\dot{C}H}.CO.NH.\underset{\textstyle COOH}{\dot{C}H}.CH_2.S.S.CH_2.\underset{\textstyle COOH}{\dot{C}H}.NH.CO.\underset{\textstyle NH_2}{\dot{C}H}.CH_3\,.$$

Werden 2 g Brompropionylcystin mit 10 ccm Ammoniak (25%) im geschlossenen Rohr $1^1/_2$ Stunde auf 50° erhitzt, so ist alles Brom abgespalten. Wird dann die Lösung auf dem Wasserbade verdampft, zum Schluß unter Zusatz von Alkohol, um das Wasser möglichst zu entfernen, so bleibt ein Gemisch von Bromammonium und Polypeptid als amorpher Rückstand. Dieser wird zuerst mit etwa 20 ccm absolutem Alkohol erwärmt, dann abgekühlt und der Niederschlag nach mehrstündigem Stehen abgesaugt, um den Rest des Bromammoniums zu entfernen. Man erwärmt dieses Produkt mit wenig Wasser, so daß keine völlige Lösung eintritt, und versetzt mit der 6—7-fachen Menge absolutem Alkohol, bis keine Fällung mehr eintritt. Das ausgeschiedene Polypeptid wird filtriert und mit Alkohol und Äther gewaschen. Die Ausbeute betrug 1,25 g oder 83% der Theorie.

Um das Präparat zu reinigen, löst man in wenig heißem Wasser und läßt langsam im Exsikkator verdunsten. Man erhält so mikroskopisch kleine Prismen, die meistens sternförmig vereinigt sind.

Für die Analyse war im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,157 g Sbst.: 0,2149 g CO_2, 0,0835 g H_2O. — 0,161 g Sbst.: 20 ccm N (17°, 759 mm). — 0,518 g Sbst.: 0,619 g $BaSO_4$.

$C_{12}H_{22}N_4S_2O_6$.	Ber. C 37,70, H 5,76, N 14,66, S 16,75.
	Gef. „ 37,33, „ 5,91, „ 14,41, „ 16,41.

Die Substanz hat keinen Schmelzpunkt; sie fängt im Kapillarrohr gegen 215° an sich zu färben und zersetzt sich bei höherer Temperatur vollständig unter Verkohlung. Im Gegensatz zum Rohprodukt ist das reine, kristallinische Präparat in Wasser schwer löslich, denn man braucht in der Siedehitze fast die fünfzigfache Menge. In Alkohol, Äther, Aceton, Benzol, Petroläther ist es noch viel schwerer löslich. Dagegen wird es leicht von Mineralsäuren und Alkalien gelöst. Für die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens diente ein besonders sorgfältig gereinigtes Präparat.

Eine Lösung von 0,2164 g in 5,0868 g Normal-Salzsäure, die das spez. Gewicht 1,03 hatte, drehte im 1-Dezimeterrohr bei 20° Natriumlicht 8,10° nach links.

Mithin $[\alpha]_D^{20} = -192{,}8°$ in salzsaurer Lösung.

Birotation wurde nicht beobachtet.

Di-α-Bromisocapronyl-cystin.

Zu einer Lösung von 5 g Cystin in 75 ccm Normal-Natronlauge fügt man allmählich und abwechselnd bei gewöhnlicher Temperatur unter starkem Schütteln 10 g α-Bromisocapronylchlorid und 50 ccm Normal-Natronlauge. Nachdem das Chlorid ganz verbraucht ist, versetzt man mit 88 ccm Normal-Salzsäure und extrahiert wiederholt mit Äther. Beim Verdampfen der mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Lösung bleibt ein Sirup, der beim Verreiben mit Petroläther nach einiger Zeit kristallinisch wird.

Die Ausbeute an diesem Produkt betrug nach dem Trocknen auf einer Tonplatte 8,5 g = 68% der Theorie. Der Verlust erklärt sich dadurch, daß nicht alles Cystin angegriffen wird; denn beim obenerwähnten Ausäthern der wässerigen Lösung entsteht in derselben ein weißer Niederschlag von unverändertem Cystin, dessen Menge 1 bis 1,5 g betrug.

Zur Reinigung des Rohprodukts wird mehrmals in Äther gelöst und mit viel Petroläther gefällt. Will man es kristallisiert haben, so versetzt man die ätherische Lösung bis zur Trübung mit Ligroïn und läßt dann im Exsikkator über Paraffin verdunsten. Man erhält so mikroskopisch kleine, glänzende, farblose Prismen, die meist büschelförmig vereinigt sind. Für die Analyse war im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,1806 g Sbst.: 0,2389 g CO_2, 0,0837 g H_2O. — 0,1712 g Sbst.: 6,7 ccm N (17°, 763 mm).

$C_{18}H_{30}N_2S_2O_6Br_2$. Ber. C 36,36, H 5,05, N 4,72.
Gef. „ 36,08, „ 5,15, „ 4,56.

Die Substanz hat keinen konstanten Schmelzpunkt, sie beginnt schon gegen 120° zu sintern und schmilzt allmählich bis 135° zu einem Öl, das sich unter Schäumen zersetzt. In kaltem Wasser ist sie schwer löslich; beim Erwärmen damit schmilzt sie und löst sich teilweise auf. In Alkohol und Aceton ist sie leicht, in Petroläther aber sehr schwer löslich.

Dileucyl-cystin.

$$\underset{NH_2}{C_4H_9.CH}.CO.NH.\underset{COOH}{CH}.CH_2.S.S.CH_2.\underset{COOH}{CH}.NH.CO.\underset{NH_2}{CH}.C_4H_9.$$

6 g Dibromisocapronylcystin werden mit 30 ccm Ammoniak (25%) eine Stunde auf 70° erhitzt, dann die Lösung auf dem Wasserbade, zuletzt unter Zusatz von Alkohol möglichst zur Trockne verdampft und später noch im Vakuumexsikkator aufbewahrt. Beim Verreiben

mit Aceton verwandelt sich der Rückstand in ein hartes, amorphes Pulver. Zur Entfernung des Bromammoniums wurde dieses in wenig Wasser gelöst und durch Zusatz von wenig Alkohol und viel Aceton gefällt. Durch 4—5 malige Wiederholung gelang es, das Bromammonium zu beseitigen. Zum Schluß wurde die Masse noch mit Alkohol und dann mit Äther ausgekocht, endlich in wenig Wasser gelöst, mit Tierkohle behandelt und das Filtrat im Exsikkator eingedunstet. Der glasartige Rückstand ließ sich zu einem farblosen Pulver zerreiben. Leider ist es nicht gelungen, die Substanz zu kristallisieren. Sie wurde für die Analyse bei 80⁰ im Vakuum getrocknet.

0,1761 g Sbst.: 0,2972 g CO_2 0,1148 g H_2O. — 0,1703 g Sbst.: 16,7 ccm N (17⁰, 766 mm).

$C_{18}H_{34}N_4S_2O_6$. Ber. C 46,35, H 7,30, N 12,02.
Gef. „ 46,03, „ 7,24, „ 11,47.

Sie hat keinen Schmelzpunkt, sondern färbt sich nach vorherigem Sintern gegen 178⁰ und zersetzt sich bei höherer Temperatur; sie ist in kaltem Wasser ziemlich leicht löslich, viel schwerer wird sie von Alkohol aufgenommen, und in Aceton, Äther, Benzol ist sie sehr schwer löslich.

---

32. Emil Fischer und Ernst Koenigs: Synthese von Polypeptiden. VIII. Polypeptide und Amide der Asparaginsäure.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 37, 4585 (1904).
(Eingegangen am 22. November.)

Aus den bisher vorliegenden Beobachtungen kann man schließen, daß Asparaginsäure und ihr Amid, das Asparagin, in den Proteïnstoffen polypeptidartig gebunden sind. Bei ihrer weiten Verbreitung in der Natur schien es uns interessant, solche peptidartige Derivate der Säure und des Amids künstlich darzustellen. Für diesen Zweck haben wir zunächst die Methode benutzt, welche bei den einbasischen Aminosäuren zum Ziele führte, d. h. die Kombination der Asparaginsäure und des Asparagins mit halogenhaltigen Säurechloriden, wie Chloracetylchlorid oder α-Bromisocapronylchlorid, und nachträglichen Ersatz des Halogens durch Amid. Es gelang so, Glycylasparagin:

$$NH_2CH_2CO.NH.\overset{\displaystyle COOH}{\dot{C}H}\\ \dot{C}H_2.CONH_2$$

und Leucylasparagin:

$$(CH_3)_2CH.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.\overset{\displaystyle COOH}{\dot{C}H}\\ \dot{C}H_2.CONH_2$$

sowie die entsprechende Leucylasparaginsäure zu erhalten.

Um umgekehrt das Radikal der Asparaginsäure in andere Aminosäuren einzuführen, schien der Weg über die Halogensuccinylverbindungen die meiste Aussicht zu bieten. Diese Produkte lassen sich in der Tat leicht durch Einwirkung von Chlor- oder Bromsuccinylchlorid auf die alkalische Lösung der Aminosäuren oder deren Ester gewinnen. Dagegen hat der zweite Teil der synthetischen Methode hier versagt. Denn bei Einwirkung von Ammoniak auf die Chlor- oder Bromsuccinyl-

verbindungen wird das Halogen nicht durch Amid ersetzt, sondern es entsteht das entsprechende Fumarylderivat, z. B. aus Chlorsuccinyldialanin, $COOH.CH(CH_3).NH.CO.CHCl.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).COOH$, das Fumaryldialanin. Glücklicherweise besitzen aber diese Fumarylkörper die Fähigkeit, bei höherer Temperatur Ammoniak zu addieren und in Asparagylderivate überzugehen. Für die Bereitung der Fumarylkörper ist der Umweg über die Halogensuccinylderivate nicht nötig. Man erhält sie direkter durch Einwirkung von Fumarylchlorid auf die Ester der Aminosäuren und nachträgliche Verseifung der hierbei entstehenden Produkte. Auf diese Weise wurde das Fumaryldialanin, $COOH.CH(CH_3).NH.CO.CH:CH.CO.NH.CH(CH_3).COOH$, und daraus durch Erhitzen mit wässerigem Ammoniak auf 100° das Asparagyldialanin, $COOH.CH(CH_3).NH.CO.CH(NH_2).CH_2.CO.NH.CH(CH_3)$ $.COOH$, gewonnen. Bei dem entsprechenden Fumaryldiglycin war allerdings das Resultat etwas anders, denn das einzige hierbei isolierte Produkt war Asparagylmonoglycin.

Während die oben erwähnten, aus optisch-aktiver Asparaginsäure hergestellten Dipeptide auch optisch-aktiv sind, handelt es sich bei den Produkten, die aus den Fumarylkörpern gewonnen wurden, selbstverständlich um inaktive Substanzen.

Nur in lockerem Zusammenhang mit obigen Versuchen stehen folgende Beobachtungen über die Metamorphose des Asparaginsäurediäthylesters.

Bei Behandlung mit flüssigem Ammoniak entsteht daraus das bisher unbekannte Asparaginsäurediamid, das durch partielle Hydrolyse mit kaltem Baryt in gewöhnliches *l*-Asparagin umgewandelt wird. Leider hat diese Methode beim Glutaminsäureester, wo man die bisher nicht verwirklichte Synthese des Glutamins erwarten durfte, ganz versagt, weil durch die Wirkung des Ammoniaks nicht das Diamid der Glutaminsäure, sondern das Amid ihres Anhydrids, der Pyrrolidoncarbonsäure, entsteht.

Da die Ester der gewöhnlichen Aminosäuren sich durch Erhitzen meist recht glatt in Diacipiperazine verwandeln lassen, so durfte man eine solche Reaktion auch beim Asparaginsäureester erwarten. Dies ist in der Tat gelungen; beim langen Stehen oder beim mäßigen Erhitzen, am besten unter Zusatz von Zinkchlorid, treten 2 Moleküle des Esters unter Austritt von 2 Molekülen Alkohol zusammen, und das hierbei resultierende Produkt halten wir für das Diacipiperazinderivat von folgender Struktur:

$$\begin{array}{l} C_2H_5O_2C.CH_2.CH.CO.NH \\ \qquad\qquad\qquad\quad NH.CO.CH.CH_2.CO_2C_2H_5 \end{array}.$$

Wird dieser Ester mit flüssigem Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur behandelt, so entsteht in glatter Weise das längst bekannte Asparaginimid, für welches die Entdecker Körner und Menozzi die einfache Formel

$$\begin{array}{l} NH_2.CH\,.\,CO \\ \quad\;\; \dot{C}H_2.CO \end{array} \!\!>\! NH$$

glaubten annehmen zu dürfen[1]). Die neue Bildungsweise scheint uns aber ein triftiger Grund, die Formel zu verdoppeln und das sogenannte Asparaginimid als Diamid der Diacipiperazindiessigsäure von der Formel

$$\begin{array}{l} NH_2.OC.CH_2.CH.CO.NH \\ \qquad\qquad\qquad\quad \dot{N}H.CO.CH.CH_2.CO.NH_2 \end{array}$$

zu betrachten.

In der Tat stimmen auch seine physikalischen Eigenschaften, wie die geringe Löslichkeit in Wasser und die Nichtschmelzbarkeit mit dieser Formel besser überein.

Chloracetyl-asparagin.

10 g gepulvertes käufliches *l*-Asparagin werden ganz kalt in 67 ccm Normal-Natronlauge gelöst und unter Schütteln und Kühlen abwechselnd mit 7,6 g Chloracetylchlorid, das in Äther gelöst ist, und 67 ccm Normal-Natronlauge versetzt. Die vom Äther getrennte Lösung wird mit 67 ccm Normal-Salzsäure angesäuert und unter stark vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Wird der Rückstand mit Alkohol ausgekocht, so geht das Chloracetylasparagin in Lösung; aus dem Filtrat fällt es auf Zusatz von Äther als bald erstarrendes Öl. Die Ausbeute betrug 7 g oder 50% der Theorie. Das Rohprodukt läßt sich aus wenig heißem Wasser umkristallisieren. Für die Analyse war über Schwefelsäure getrocknet.

0,1810 g Sbst.: 0,2295 g CO_2, 0,0707 g H_2O. — 0,1836 g Sbst.: 20,8 ccm N (18°, 756 mm).

$C_6H_9N_2O_4Cl$. Ber. C 34,45, H 4,31, N 13,39.
Gef. „ 34,58, „ 4,33, „ 13,01.

Das Chloracetylasparagin schmilzt bei 148—149° (korr.) und kristallisiert aus Wasser in feinen Nadeln. Es löst sich in ungefähr 10 Teilen kaltem Wasser; sehr leicht löslich ist es in heißem Wasser, Alkohol und Aceton, aber sehr schwer in Äther, Petroläther, Chloroform.

---

[1]) Gaz. chim. **17**, 173.

Glycyl-asparagin, $\begin{array}{l} NH_2.CH_2.CO.NH.CH—CH_2 \\ \qquad\qquad\qquad\quad HO_2\dot{C} \quad \dot{C}O.NH_2 \end{array}$.

Erhitzt man 5 g Chloracetylasparagin mit 30 ccm wässerigem Ammoniak von 25% eine Stunde auf 100°, so ist alles Halogen abgespalten, und nach dem Erkalten trübt sich die Flüssigkeit durch Abscheidung eines geringen flockigen Niederschlages. Das Filtrat wird unter geringem Druck zum Sirup eingedampft, dann mit wenig Wasser aufgenommen und mit Alkohol gefällt. Das anfänglich ölige Produkt erstarrt allmählich. Es wird durch wiederholtes Lösen und Fällen mit Alkohol gereinigt und bildet dann farblose, feine Nadeln. Die Ausbeute an schon fast reinem Produkt betrug 55% der Theorie. Für die Analyse wurde über Schwefelsäure getrocknet.

0,1803 g Sbst.: 0,2512 g CO_2, 0,0939 g H_2O. — 0,1404 g Sbst.: 22,05 ccm $^1/_{10}$ Normalammoniak (Kjeldahl).

$C_6H_{11}O_4N_3$. Ber. C 38,10, H 5,82, N 22,22.
Gef. „ 38,00, „ 5,84, „ 21,99.

Das Glycylasparagin schmilzt nach vorherigem Sintern bei 216° (korr.) unter Zersetzung. Die wässerige Lösung dreht schwach nach links. Eine approximative Bestimmung in 7-prozentiger Lösung ergab $[\alpha]_D^{20°} = -6,4°$.

Das Glycylasparagin ist in Wasser sehr leicht, in Alkohol sehr schwer löslich und kristallisiert beim Fällen in kleinen Nadeln, welche vielfach zu kugelförmigen Aggregaten vereinigt sind. Die wässerige Lösung rötet Lakmus. In alkalischer Lösung gibt es mit Kupfersalz eine starke rotviolette Färbung. Es wird von Quecksilberchlorid und Ferrocyanwasserstoffsäure nicht gefällt. Sein Geschmack ist wenig ausgeprägt, äußerst schwach säuerlich, aber nicht süß.

Chloracetyl-asparaginsäureester.

18 g *l*-Asparaginsäureester werden in etwa der 5-fachen Menge Äther gelöst und 4,2 g trocknes Natriumcarbonat in wenig Wasser zugefügt. Hierauf wird vorsichtig unter Umschütteln portionenweise 10,8 g Chloracetylchlorid, gleichfalls mit 5 Teilen Äther verdünnt, zugegeben. Beim Zugießen des Chlorids entsteht jedesmal eine Fällung von salzsaurem Ester, die beim Umschütteln mit der Sodalösung wieder verschwindet. Nach beendigter Reaktion wird die ätherische Lösung abgehoben, mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und abgedampft. Es hinterbleibt ein Öl, welches im Vakuum über Schwefelsäure erstarrt. Ausbeute 20 g oder 80% der Theorie. Der Ester wurde zur

Analyse aus wenig Alkohol umkristallisiert und so in derben Spießen erhalten. Schmp. 46—47°.

0,1860 g Sbst.: 0,3065 g CO_2, 0,1010 g H_2O. — 0,2739 g Sbst.: 12,5 ccm N (21°, 759 mm).

$C_{10}H_{16}O_5NCl$.	Ber. C 45,19,	H 6,03,	N 5,26.
	Gef. „ 44,94,	„ 6,03,	„ 5,19.

Der Chloracetylasparaginsäureester ist ziemlich schwer löslich in kaltem Wasser, spielend löslich in Alkohol und Äther; in Petroläther ist er selbst in der Wärme ziemlich schwer löslich und läßt sich daraus durch Abkühlen leicht in langen Nadeln erhalten.

Bemerkenswert ist die Wirkung von starkem, alkoholischem Ammoniak auf den Ester. Bei 100° erzeugt es nämlich einen Körper von der Formel $C_6H_9O_3N_3$, für dessen Bildung folgende Gleichung gilt:

$$C_{10}H_{16}O_5NCl + 3\,NH_3 = ClNH_4 + C_6H_9O_3N_3 + 2\,C_2H_6O\,.$$

Wir sind der Ansicht, daß dies neue Produkt ein Piperazinderivat von folgender Struktur ist: $\begin{array}{l}NH.CO.CH.CH_2.CONH_2\\ \cdot\qquad\quad\;\cdot\\ CH_2.CO.NH\end{array}$, und daß seine Bildung dem Übergang von Chloracetylalaninester in Glycylalaninanhydrid[1]) entspricht. Da man gleichzeitig obige Substanz als ein Derivat des Asparagins betrachten kann, so geben wir ihr — natürlich unter Voraussetzung, daß ihre Struktur von uns richtig beurteilt wird — den Namen:

Anhydro-glycyl-asparagin.

2 g Chloracetylasparaginsäureester werden mit 20 ccm bei 0° gesättigtem, alkoholischem Ammoniak 1 Stunde auf 100° im geschlossenen Rohr erhitzt. Nach dem Erkalten haben sich zahlreiche Öltröpfchen abgeschieden, die nach einiger Zeit erstarren, während die alkoholische Lösung stark gelb gefärbt ist. Beim Einengen der alkoholischen Lösung und beim Verjagen des Ammoniaks fällt noch eine weitere Menge des Öls. Dies wird in etwa 10 Teilen kochendem Wasser gelöst. Beim Erkalten fallen feine, verfilzte Nadeln aus. Ausbeute 0,6 g oder 47% der Theorie. Die übrigen Produkte der Reaktion sind nicht untersucht. Beim Erhitzen im Röhrchen bräunt sich der Körper gegen 245° (korr.) und zersetzt sich vollständig unter Aufschäumen gegen 274° (korr.). Zur Analyse wurde er 2 Stunden bei 100° getrocknet.

---

[1]) E. Fischer und Erich Otto, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2113 [1903]. (*S. 321.*)

0,1747 g Sbst.: 0,2710 g CO_2, 0,0841 g H_2O. — 0,1163 g Sbst.: 24,1 ccm N (18°, 770 mm).

$C_6H_9O_3N_3$. Ber. C 42,11, H 5,27, N 24,56.
Gef. „ 42,31, „ 5,34, „ 24,27.

Das Anhydroglycylasparagin ist schwer löslich in kaltem, ziemlich leicht löslich in heißem Wasser. Es gibt eine schwache Biuretreaktion und schmeckt schwach bitter. Beim Kochen mit verdünnter Natronlauge verliert es genau $^1/_3$ seines Stickstoffs als Ammoniak.

Anhydro-glycyl-asparaginsäureäthylester,

$$\begin{array}{l} CH_2.NH.CO \\ \dot{C}O.NH.\dot{C}H.CH_2.CO_2C_2H_5 \end{array}.$$

Diese Verbindung ist ein Zwischenprodukt bei der zuvor beschriebenen Reaktion und läßt sich isolieren, wenn der Chloracetylasparaginsäureester nicht mit konzentriertem, sondern mit verdünntem, alkoholischem Ammoniak behandelt wird.

3 g Chloracetylasparaginsäureester werden 2 Stunden mit 20 ccm zweieinhalbfach normalem, alkoholischem Ammoniak auf 100° im Einschlußrohr erhitzt. Nach dem Erkalten erstarrt die Lösung infolge der Abscheidung einer voluminösen, weißen Masse. Diese wird in etwa 10 Teilen heißem Wasser gelöst. Sie kristallisiert daraus beim Erkalten in schönen, rautenförmigen Täfelchen. Schmp. 211—212° (korr.) unter Gelbfärbung. Ausbeute 0,8 g.

Zur Analyse wurde nochmals aus heißem Alkohol kristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1585 g Sbst.: 0,2807 g CO_2, 0,0847 g H_2O. — 0,1263 g Sbst.: 15,7 ccm N (21°, 756,5 mm).

$C_8H_{12}O_4N_2$. Ber. C 48,00, H 6,00, N 14,00.
Gef. „ 48,29, „ 6,06, „ 14,07.

In Alkohol ist die Substanz auch in der Wärme ziemlich schwer löslich.

α-Bromisocapronyl-asparagin,

$$(CH_3)_2CH.CH_2.CHBr.CO.NH.CH(COOH).CH_2.CONH_2.$$

10 g wasserhaltiges *l*-Asparagin werden in 67 ccm Normalalkali gelöst und dann in kleinen Portionen weitere 67 ccm Alkali und 14,3 g Bromisocapronylchlorid unter energischem Umschütteln zugefügt, wobei man Sorge trägt, daß sich die Temperatur möglichst bei 10° hält; denn durch stärkeres Kühlen wird die Reaktion sehr verlangsamt. Beim Übersättigen der Lösung mit Salzsäure fällt ein dicker, weißer,

kristallinischer Niederschlag. Ausbeute 14,5 g oder 70% der Theorie. Da von den beiden Komponenten der Verbindung eine optisch-aktiv und die andere ein inaktives Gemisch von zwei optischen Antipoden ist, da ferner die Ausbeute mehr als 50% der Theorie beträgt, so muß das Produkt ein Gemisch von zwei stereoisomeren Formen sein.

In der Tat läßt sich das Rohprodukt durch Kristallisation aus Wasser in einen schwer und einen leichter löslichen Teil zerlegen, die sich außerdem noch durch ihr optisches Verhalten stark unterscheiden. Die Trennung der beiden Isomeren, von denen das schwerer lösliche im Rohprodukt an Menge überwiegt, wird anfangs am leichtesten durch fraktioniertes Ausfällen aus der alkalischen Lösung bewerkstelligt. Die letzte Reinigung geschieht dann durch Kristallisation aus Wasser. Der schwerlösliche Körper scheidet sich aus der heißen, wässerigen Lösung in langen schmalen Prismen ab, die makroskopisch wie Nadeln aussehen. Schmp. gegen 178° (korr.) unter Zersetzung. Zur Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1772 g Sbst.: 0,2515 g CO_2, 0,0864 g H_2O. — 0,1880 g Sbst.: 14,9 ccm N (21°, 760 mm). — 0,1950 Sbst.: 0,1169 AgBr.

$C_{10}H_{17}O_4N_2Br$.	Ber. C 38,83,	H 5,50,	N 9,06,	Br 25,89.
	Gef. „ 38,71,	„ 5,42,	„ 9,03,	„ 25,65.

Die Substanz löst sich in etwa 20 Teilen heißem und ungefähr 75 Teilen kaltem Wasser. — In Alkohol ist sie bedeutend leichter löslich.

Für die optische Untersuchung diente die alkalische Lösung.

0,2490 g Sbst. gelöst in 0,8363 g Normal-Natronlauge und 3,1776 g Wasser drehten Natriumlicht bei 20° im Dezimeterrohr 1,54° nach links. Spez.-Gew. 1,03, Prozentgehalt 5,84

$$[\alpha]_D^{20} = -25,6^0.$$

Das leichter lösliche Isomere haben wir vielleicht noch nicht ganz rein gehabt. Unser Produkt schmolz gegen 148° (korr.) und zeigte in 5,7-prozentiger Lösung $[\alpha]_D = +15,4^0$. Wir werden in einer späteren Abhandlung auf diesen Körper zurückkommen.

Die Trennung des rohen Bromisocapronylasparagins in die beiden Isomeren ist uns erst am Schlusse der Untersuchung gelungen. Das nachfolgende Leucylasparagin wurde deshalb noch mit dem Rohprodukt bereitet. Da dieses aber zu etwa 70% aus dem schwerlöslichen Bromkörper besteht, so glauben wir, daß das Leucylasparagin, wofern es überhaupt einheitlich ist, dem schwerlöslichen Bromkörper entspricht. Nach den jetzt vorliegenden Beobachtungen zweifeln wir nicht daran, daß auch die folgenden Derivate der aktiven Asparaginsäure Gemische von

2 Isomeren sind, deren Trennung ebenfalls die Aufgabe späterer Versuche sein muß.

Leucyl-asparagin,

$(CH_3)_2CH.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH(COOH).CH_2.CONH_2$.

10 g Bromisocapronylasparagin werden in 75 ccm wässerigem Ammoniak vom spez. Gewicht 0,91 gelöst und 6 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird dann auf dem Wasserbade zum Sirup verdampft und mehrmals auf Zusatz von Wasser und Alkohol wieder eingedampft, um gebundenes Ammoniak möglichst zu entfernen. Man löst den Rückstand in etwa 10 Teilen 95-prozentigem Alkohol und fällt mit der doppelten Menge absolutem Alkohol. Die Mutterlauge wird mit Petroläther gefällt und der Niederschlag in gleicher Weise mit Alkohol behandelt. Der weiße, flockige, sehr hygroskopische Niederschlag wird in wenig Wasser gelöst und dieses vorsichtig im Exsikkator zur Trockne eingedunstet.

Nach kurzer Zeit scheidet sich das Leucylasparagin in makroskopischen, ziemlich flächenreichen Prismen ab. Ausbeute 3,5 g oder 40% der Theorie. Das im Vakuum über Schwefelsäure 24 Stunden getrocknete Präparat enthielt noch 2 Moleküle Kristallwasser, die es erst bei 100° im Vakuum verliert.

0,4104 g verloren in 4 Stunden bei 100° und 17 mm Druck 0,0519 g Wasser oder 12,64%. Berechnet für $C_{10}H_{19}O_4N_3 + 2\,H_2O$: 12,81%. Die so getrocknete Substanz wurde analysiert.

0,1667 g Sbst.: 0,1190 g H_2O, 0,3010 g CO_2. — 0,1918 g Sbst.: 28,4 ccm N (23°, 763 mm).

$C_{10}H_{19}O_4N_3$.	Ber.	C 49,00,	H 7,75,	N 17,14.
	Gef.	„ 49,24,	„ 7,93,	„ 16,76.

Das Leucylasparagin verliert beim schnellen Erhitzen im Kapillarrohr sein Kristallwasser unter Aufschäumen und Gelbfärbung gegen 195° (korr.); die Masse erstarrt dann wieder und schmilzt gegen 230° (korr.) unter stärkerer Zersetzung. Geschmack ziemlich indifferent. Es gibt in ziemlich konzentrierter Lösung mit Phosphorwolframsäure einen amorphen Niederschlag, und mit Alkali und Kupfervitriol eine ins Bläuliche spielende Biuretfärbung.

α-Bromisocapronyl-asparaginsäureester.

10 g *l*-Asparaginsäureester werden unter Zugabe von 2,81 g Natriumcarbonat mit 11,5 g α-Bromisocapronylchlorid in der beim Chloracetylasparaginsäureester angegebenen Weise kombiniert. Beim Abdunsten

des Äthers hinterbleibt eine kristallinische Masse, die in wenig Alkohol gelöst und daraus mit Wasser gefällt wird. Ausbeute 17 g oder 88% der Theorie. Zur Analyse wurde aus wenig Alkohol umkristallisiert und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

0,1755 g Sbst.: 0,2966 g CO_2, 0,1050 g H_2O. — 0,1898 g Sbst.: 0,0994 g AgBr.

$C_{14}H_{24}O_5NBr$. Ber. C 45,90, H 6,56, Br 21,83.

Gef. „ 46,09, „ 6,65, „ 22,28.

Der Bromisocapronylasparaginsäureester kristallisiert in sehr feinen, langgestreckten Blättchen, die häufig wie Nadeln aussehen und bei 61—62° (korr.) schmelzen.

Er ist sehr leicht löslich in Alkohol und Äther, schwer löslich in heißem Wasser, aus dem er als Öl fällt, das nur langsam erstarrt.

α-Bromisocapronyl-asparaginsäure.

12 g Ester werden, fein gepulvert, mit 67 ccm Normal-Natronlauge 2 Stunden geschüttelt, wobei bis auf einen ganz geringen Rest alles in Lösung geht. Das Filtrat wird mit der obigen Alkalimenge entsprechenden Quantität Salzsäure versetzt, auf etwa 40 ccm unter stark vermindertem Druck eingeengt und 12 Stunden bei 0° gelassen.

Es haben sich dann in großer Menge kleine, weiße, meist kugelige Kristallaggregate abgeschieden, die abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen werden. Ausbeute 9 g oder 90% der Theorie. Zur Analyse wurde aus heißem Wasser umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1511 g Sbst.: 0,2129 g CO_2, 0,0720 g H_2O. — 0,2044 g Sbst.: 0,1256 g AgBr.

$C_{10}H_{16}O_5NBr$. Ber. C 38,71, H 5,16, Br 25,81.

Gef. „ 38,43, „ 5,29, „ 26,14.

Die Säure schmilzt bei 152—154° (korr.). Sie löst sich in etwa 3 Teilen kochendem und 12 Teilen kaltem Wasser. Sie ist sehr leicht löslich in Alkohol und Äther.

Leucyl-asparaginsäure,

$$(CH_3)_2CH.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.\underset{\displaystyle COOH}{CH}.CH_2.COOH$$

10 g Bromisocapronylasparaginsäure werden in 100 ccm wässerigem Ammoniak vom spez. Gewicht 0,91 gelöst und 6 Tage bei Zimmertemperatur gelassen. Die Lösung wird dann auf dem Wasserbade zum Sirup verdampft und nach Zusatz von Wasser und Alkohol wieder eingeengt. Diese Operation wiederholt man 5—6 mal, bis kein Am-

moniakgeruch mehr bemerkbar ist. Hierauf wird der Rückstand in wenig Wasser gelöst, in der Wärme so viel Alkohol zugefügt, bis eben Fällung eintritt, und so lange gekocht, bis diese eben wieder verschwunden ist. Beim Erkalten scheidet sich die Leucylasparaginsäure in sehr kleinen, farblosen Nadeln oder schmalen Prismen ab. Sie wird abgesaugt und mit 80-prozentigem Alkohol wiederholt gewaschen. Die Mutterlaugen werden mit Äther versetzt und die hierbei entstehende, weiße, flockige Fällung wiederum aus wässerigem Alkohol kristallisiert. Ausbeute 4 g oder 50% der Theorie. Zur Analye wurde das Präparat aus 60-prozentigem Alkohol umkristallisiert. Über Schwefelsäure 12 Stunden getrocknet, enthält die Leucylasparaginsäure noch 1 Mol. Wasser.

0,1280 g Sbst.: 0,2137 g CO_2, 0,0883 g H_2O. — 0,1312 g Sbst.: 10,15 ccm $^1/_{10}$*n*-Ammoniak (Kjeldahl).

$C_{10}H_{18}O_5N_2 + H_2O$. Ber. C 45,45, H 7,58, N 10,67.
Gef. „ 45,53, „ 7,67, „ 10,83.

0,1811 g Sbst. verloren bei 100⁰ im Vakuum 0,0119 g Wasser. Berechnet für $C_{10}H_{18}O_5N_2 + 1\,H_2O$: 6,82%. Gef. 6,57. Die so getrocknete Substanz, die sehr hygroskopisch ist, wurde analysiert.

0,1537 g Sbst.: 0,2727 g CO_2, 0,1038 g H_2O. — 0,1272 g Sbst.: 10,08 ccm $^1/_{10}$*n*-Ammoniak.

$C_{10}H_{18}O_5N_2$. Ber. C 48,78, H 7,32, N 11,37.
Gef. „ 48,38, „ 7,50, „ 11,09.

Die Leucylasparaginsäure schmilzt in wasserhaltigem Zustande gegen 180—182⁰ (korr.) unter Aufschäumen. Sie ist spielend löslich in Wasser, dagegen fast unlöslich in absolutem Alkohol. Reaktion und Geschmack sind ziemlich stark sauer.

Fumaryl-diglycin,

$COOH.CH_2.NH.CO.CH:CH.CO.NH.CH_2.COOH$.

Die Verbindung wird am bequemsten auf dem Umweg über ihren Ester dargestellt. Gießt man eine ätherische Lösung von 12 g Fumarylchlorid in eine gut gekühlte, verdünnte, ätherische Lösung von Glycinester, so findet eine lebhafte Reaktion statt, und es fällt ein Gemisch von salzsaurem Glycinester und Fumaryldiglycinester als weiße, voluminöse, aber kristallisierte Masse. Sie wird abgesaugt, mit Äther gewaschen und in etwa 1 L heißem Wasser gelöst; beim Erkalten fällt der Fumaryldiglycinester meist in langen, farblosen Nadeln aus. Die Ausbeute betrug 15 g oder 67% der Theorie. Für die Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1721 g Sbst.: 14,45 ccm N (19,5°, 760 mm). — 0,1689 g Sbst.: 0,3129 g CO_2, 0,0971 g H_2O.

$C_{12}H_{18}O_6N_2$. Ber. C 50,35, H 6,29, N 9,79.
Gef. „ 50,52, „ 6,38, „ 9,63.

Der Fumaryldiglycinester löst sich in etwa 75 Teilen heißem und etwa 1000 Teilen kaltem Wasser, Schmp. 211° (korr.). Zur Verseifung des Esters werden 10 g mit 60 ccm Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur 1 Stunde geschüttelt, wobei Lösung erfolgt. Beim Übersättigen mit Salzsäure fällt dann das Fumaryldiglycin als farblose, weiße Blättchen, die unter dem Mikroskop vielfach als schiefe, vierseitige Täfelchen erscheinen. Sie werden nach einstündigem Stehen bei 0° filtriert. Die Ausbeute betrug 88% der Theorie. Für die Analyse wurde ein mit Wasser gewaschenes und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknetes Präparat benutzt.

0,1705 g Sbst.: 0,0678 g H_2O, 0,2619 g CO_2. — 0,2001 g Sbst.: 21,5 ccm N (23°, 759 mm).

$C_8H_{10}O_6N_2$. Ber. C 41,74, H 4,35, O 12,18.
Gef. „ 41,89, „ 4,42, „ 12,08.

Das Fumaryldiglycin löst sich in etwa 60 Teilen heißem und ungefähr 1200 Teilen kaltem Wasser. Es schmilzt gegen 290° (korr.) unter Zersetzung.

Asparagyl-monoglycin (inaktiv),

$$\begin{matrix} CO.NH.CH_2.COOH \\ \dot{C}H.NH_2 \\ \dot{C}H_2.COOH \end{matrix} \quad \text{oder} \quad \begin{matrix} COOH \\ \dot{C}H.NH_2 \\ \dot{C}H_2.CO.NH.CH_2.COOH \end{matrix}.$$

Wird Fumaryldiglycin mit der 7-fachen Menge wässerigen Ammoniaks vom spez. Gewicht 0,91 im geschlossenen Rohr 4 Stunden auf 100° erhitzt, so gibt die Flüssigkeit beim Ansäuern keinen Niederschlag mehr, enthält also nicht mehr das schwerlösliche Fumaryldiglycin. Beim Eindampfen unter stark vermindertem Druck bleibt ein Sirup. Da derselbe auch bei mehrtägigem Stehen nur eine geringe Menge von Kristallen abschied, die gegen 250° schmolzen, und außerdem gebundenes Ammoniak enthielt, so wurde er zur Entfernung des letzteren in Wasser gelöst, mit $1^1/_2$ Molekül Barythydrat (berechnet auf das ursprüngliche Fumaryldiglycin) versetzt und unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Dann wurde wieder in Wasser gelöst und abermals in derselben Weise verdampft, bis eine Probe der Masse keinen Ammoniakgeruch mehr gab. Wir vermuten, daß in dem ursprünglichen Reaktionsprodukt Asparagyldiglycin enthalten war, daß

es aber durch die Wirkung des Baryts zum Teil in das besser kristallisierende Asparagylmonoglycin überging. Man löst schließlich den Rückstand in Wasser, fällt in verdünnter Lösung den Baryt genau mit Schwefelsäure und verdampft das Filtrat unter stark vermindertem Druck. Dabei erfolgt die Kristallisation des Asparagylmonoglycins. Die Ausbeute schwankt und betrug durchschnittlich 30% des angewandten Fumarylkörpers. Die anderen Produkte der Reaktion sind bisher nicht isoliert worden.

Zur Reinigung wurde das Präparat aus heißem Wasser, in dem es leicht löslich ist, umkristallisiert. Im Vakuum über Schwefelsäure 12 Stunden getrocknet, enthielt es 1 Mol. Kristallwasser.

0,1497 g Sbst.: 0,1900 g CO_2, 0,0788 g H_2O. — 0,1379 g Sbst.: 13,1 ccm $^1/_{10}$ Normalammoniak (Kjeldahl).

$C_6H_{10}O_5N_2 + H_2O$. Ber. C 34,62, H 5,77, N 13,46.
Gef. „ 34,61, „ 5,85, „ 13,30.

Das Wasser entweicht bei 100°, aber sehr langsam.

0,2565 g Sbst. verloren bei 12-stündigem Erhitzen auf 100° im Vakuum 0,0228 g H_2O oder 8,58% anstatt 8,62% der Theorie.

Die im Vakuum bei 100° völlig getrocknete Substanz gab folgende Zahlen.

0,1818 g Sbst.: 0,2533 g CO_2, 0,0890 g H_2O. — 0,1520 g Sbst.: 15,67 ccm $^1/_{10}$ Normalammoniak.

$C_6H_{10}O_5N_2$. Ber. C 37,89, H 5,26, N 14,74.
Gef. „ 38,00, „ 5,48, „ 14,43.

Das trockne Präparat schmilzt bei 148° (korr.) ohne Zersetzung, das wasserhaltige gegen 165° (korr.) unter Aufschäumen. Es bildet kleine Kriställchen, die unter dem Mikroskop meistens wie Wetzsteine aussehen.

Daß die Verbindung wirklich ein Derivat der Asparaginsäure ist, beweist die Hydrolyse, denn sie zerfällt dabei glatt in Glykocoll und inaktive Asparaginsäure. Um diese Spaltung auszuführen, wurde das Dipeptid mit der 6-fachen Menge 20-prozentiger Salzsäure einige Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann die Lösung auf dem Wasserbade verdampft, bis der Rückstand kristallisierte. Für die Trennung der beiden Aminosäuren diente die verschiedene Löslichkeit der salzsauren Äthylester in Alkohol.

Um die Veresterung auszuführen, wurde das feste Gemenge der Hydrochlorate in der 5-fachen Menge absolutem Alkohol warm gelöst, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und noch einige Zeit auf dem Wasserbade erhitzt. Dann wurde die Flüssigkeit unter sehr geringem Druck verdampft und der Rückstand nochmals in gleicher Weise mit

Alkohol und Salzsäure behandelt, um die Veresterung zu vervollständigen. Die salzsaure Lösung blieb jetzt 24 Stunden bei 0° stehen, wobei der salzsaure Glykocollester zum allergrößten Teil kristallisierte. Seine Menge betrug nach dem Absaugen, Waschen mit kaltem Alkohol und Trocknen 92% der Theorie. Das Filtrat, welches den Asparaginsäureester enthielt, wurde auf dem Wasserbade verdampft, der Rückstand zur Verseifung des Esters mit starker wässeriger Salzsäure kurze Zeit am Rückflußkühler gekocht und dann die Lösung abermals zum Sirup verdampft. Nachdem aus der verdünnten wässerigen Lösung des Rückstandes die Salzsäure durch Silbercarbonat genau gefällt war, gab das eingeengte Filtrat eine reichliche Kristallisation von optisch inaktiver Asparaginsäure.

0,1904 g Sbst.: 0,2540 g CO_2, 0,0920 g H_2O. — 0,1872 g Sbst.: 16,5 ccm N (16°, 772 mm).

$C_4H_7O_4N$. Ber. C 36,10, H 5,27, N 10,53.
Gef. „ 36,38, „ 5,36, „ 10,45.

Fumaryl-dialanin.

Die Darstellung ist genau wie beim Fumaryldiglycin. Als Ausgangsmaterial diente optisch inaktiver Alaninäthylester. Die Ausbeute an Fumaryldialaninester betrug 62% der Theorie. Er schmilzt bei 203—205° (korr.) und gleicht im übrigen sehr dem Glycinkörper.

0,1782 g Sbst.: 14,3 ccm N (18°, 753 mm). — 0,1919 g Sbst.: 0,3760 g CO_2 0,1227 g H_2O.

$C_{14}H_{22}O_6N_2$. Ber. C 53,50, H 7,01, N 8,92.
Gef. „ 53,44, „ 7,10, „ 8,75.

Das daraus durch Verseifung in der Kälte gewonnene Fumaryldialanin ist in Wasser recht schwer löslich; denn es verlangt davon selbst in der Hitze ungefähr 400 Teile und fällt beim Erkalten als farbloses, kristallinisches Pulver, das unter dem Mikroskop meist als sehr kleine, rhombenähnliche Blättchen erscheint.

0,1768 g Sbst.: 16,4 ccm N (24°, 763 mm). — 0,1695 g Sbst.: 0,2898 g CO_2, 0,0837 g H_2O.

$C_{10}H_{14}O_6N_2$. Ber. C 46,51, H 5,43, N 10,85.
Gef. „ 46,63, „ 5,46, „ 10,46.

Es schmilzt gegen 275° (korr.) unter Zersetzung. Das Natriumsalz ist verhältnismäßig schwer löslich, denn es fällt schon bei der Verseifung des Esters mit der berechneten Menge Normal-Natronlauge teilweise aus.

Asparagyl-dialanin (inaktiv),

HOOC.CH(CH_3).NH.CO.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH(CH_3).COOH.

10 g Fumaryldialanin werden mit 75 ccm wässerigem Ammoniak vom spez. Gewicht 0,91 4 Stunden im geschlossenen Rohr auf 100° erhitzt, und das Ammoniumsalz in der beim Asparagylmonoglycin angegebenen Weise mit Baryt zerlegt. Das Filtrat vom schwefelsauren Baryt wird bis zur Konsistenz eines dünnen Sirups unter stark vermindertem Druck eingeengt und mit absolutem Alkohol im Überschuß versetzt. Es fällt eine weiße, schleimige Masse, die nach einiger Zeit kristallinisch und zwar meist zu warzenartigen Aggregaten erstarrt. Die Lösung wird abgegossen und die am Boden haftende Masse wiederholt mit absolutem Alkohol überschichtet und endlich im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die Ausbeute läßt auch hier zu wünschen übrig, denn sie betrug nur 35% des angewandten Fumaryldialanins. Die Substanz ist anfangs etwas hygroskopisch. Sie wird deshalb im Vakuum bei der Temperatur des siedenden Alkohols getrocknet und läßt sich dann leicht pulvern. Für die Analyse wurde sie nochmals in wenig Wasser gelöst und wieder in obiger Weise durch Alkohol abgeschieden. Bei 78° im Vakuum getrocknet enthält sie noch 2 Mol. Wasser, die sie bei 100° im Vakuum unter Aufblähen verliert.

0,2294 g Sbst. verloren bei 100° im Vakuum 0,0273 g Wasser oder 11,90%; berechnet für $C_{10}H_{17}O_6N_3 + 2\,H_2O$ 11,58%.

Die so getrocknete Substanz gab folgende Werte:

0,1590 g Sbst.: 0,0907 g H_2O, 0,2540 g CO_2. — 0,1534 g Sbst.: 20,4 ccm N (26°, 764 mm).

$C_{10}H_{17}O_6N_3$. Ber. C 43,64, H 6,18, N 15,24.
Gef. „ 43,57, „ 6,33, „ 14,90.

Das wasserhaltige Asparagyldialanin verliert beim schnellen Erhitzen im Röhrchen gegen 115° (korr.) unter Aufschäumen sein Kristallwasser und erstarrt dann wieder zu feinen Blättchen, die gegen 150° (korr.) schmelzen. Es ist überaus leicht löslich in Wasser, sehr schwer dagegen in Alkohol. Geschmack und Reaktion sind sauer; es löst Kupferoxyd mit blauer Farbe.

Fumaryl-diasparaginsäureester,

CO.NH.CH.CH_2.$COOC_2H_5$
CH $COOC_2H_5$
‥
CH $COOC_2H_5$
CO.NH.CH.CH_2.$COOC_2H_5$.

3 g Fumarylchlorid werden in Äther gelöst und zu 15 g Asparaginsäureester, der gleichfalls in viel Äther gelöst ist, vorsichtig und unter guter Kühlung zugegeben. Es scheidet sich eine weiße, voluminöse

Masse ab, aus der der salzsaure Asparaginsäureester mit kochendem Wasser ausgezogen wird. Der weiße Rückstand läßt sich aus absolutem Alkohol leicht umkristallisieren. Ausbeute 8 g oder 90% der Theorie. Schmp. 195° (korr.). Zur Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1826 g Sbst.: 0,3521 g CO_2, 0,1072 g H_2O. — 0,1924 g Sbst.: 10,2 ccm N (22°, 765 mm).

$C_{20}H_{30}O_{10}N_2$. Ber. C 52,40, H 6,55, N 6,12.
Gef. „ 52,58, „ 6,53, „ 6,05.

Der Körper ist auch in heißem Wasser sehr schwer löslich und kristallisiert daraus in sehr feinen, biegsamen Nadeln. In heißem Alkohol ist er ziemlich leicht löslich.

Bei 5-stündigem Erhitzen mit überschüssigem methylalkoholischem Ammoniak auf 100° gibt er mehrere kristallinische Produkte, deren Untersuchung noch nicht beendigt ist.

Chlorsuccinyl-dialanin,

$HOOC.CH(CH_3).NH.CO.CH_2.CHCl.CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

4,8 g Alanin werden in 53 ccm Normal-Natronlauge gelöst und in einer Kältemischung abgekühlt. Dazu fügt man unter dauerndem Schütteln abwechselnd und in kleinen Portionen 5 g Chlorsuccinylchlorid und 53 ccm Normal-Natronlauge. Die von einer geringen harzigen Masse abfiltrierte Flüssigkeit wird mit 53 ccm Normal-Salzsäure angesäuert und unter stark vermindertem Druck eingedampft. Dabei scheidet sich bald das Chlorsuccinyldialanin kristallinisch ab. Die Ausbeute war ziemlich gering, denn sie betrug nur 2,5 g. Zur Reinigung wurde aus heißem Wasser umgelöst und für die Analyse im Vakuum getrocknet.

0,2004 g Sbst.: 0,0941 g AgCl. — 0,2024 g Sbst.: 0,3043 g CO_2 und 0,0959 g H_2O.

$C_{10}H_{15}O_6N_2$. Ber. C 40,75, H 5,09, Cl 12,05.
Gef. „ 41,01, „ 5,26, „ 11,70.

Die Verbindung schmilzt gegen 210° (korr.) unter Zersetzung; sie kristallisiert aus heißem Wasser, worin sie leicht löslich ist, in langen Prismen.

Läßt man ihre Lösung in überschüssigem, flüssigem oder in konzentriertem, wässerigen Ammoniak 1—2 Tage stehen, so verliert sie alles Halogen und gibt große Mengen von Fumaryldialanin. Ganz ähnlich verhält sich das Bromsuccinyldialanin, das wir aus Bromsuccinylchlorid ganz entsprechend obiger Vorschrift dargestellt haben.

Darstellung des Asparaginsäure-diäthylesters.

Als Ausgangsmaterial für die Bereitung des Esters kann man an Stelle der Asparaginsäure das viel billigere Asparagin verwenden, da bei längerem Kochen mit alkoholischer Salzsäure die Amidgruppe verseift und in die Estergruppe verwandelt wird.

25 g Asparagin, das bei 100° getrocknet und fein gepulvert ist, werden in 125 g heißem absoluten Alkohol suspendiert, die Flüssigkeit unter Umschütteln mit trocknem Salzsäuregas gesättigt und dann 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das Asparagin geht ziemlich schnell in Lösung und später scheidet sich Chlorammon ab. Zum Schluß wird filtriert und der Asparaginsäureester in der früher beschriebenen Weise[1]) isoliert. Die Ausbeute betrug 70% der Theorie.

Der Ester zeigt die gleichen Eigenschaften, besonders auch das gleiche optische Drehungsvermögen, wie der aus Asparaginsäure hergestellte.

Asparaginsäure-diamid, $NH_2.CO.CH_2.CH(NH_2).CO.NH_2$.

Bringt man 5 g Asparaginsäureester mit etwa dem 3-fachen Volumen flüssigem trocknen Ammoniak im Einschmelzrohr zusammen, so entsteht anfangs eine klare, farblose Lösung. Bei Zimmertemperatur färbt sie sich allmählich gelblich und scheidet nach etwa 2 Tagen eine kleine Menge farbloser, meist zu warzenförmigen Aggregaten vereinigter Kristalle ab. Öffnet man nach 4 Tagen das Rohr, so bleibt nach dem Abdunsten des Ammoniaks eine weiße, lockere Masse, die schwach nach Ester riecht, zurück. Daraus ließen sich zwei Produkte isolieren: das Asparaginimid von Körner und Menozzi[2]) und das noch unbekannte Asparaginsäurediamid. Ersteres, dessen Menge etwa ein Viertel des festen Rückstandes beträgt, läßt sich wegen seiner geringen Löslichkeit in Wasser am leichtesten isolieren. Man laugt dann nur mit kaltem Wasser aus und kristallisiert den Rückstand aus heißem Wasser.

0,0996 g Sbst.: 0,1534 g CO_2, 0,0487 g H_2O. — 0,1017 g Sbst.: 22,5 ccm N (26°, 766 mm).

$C_4H_6O_2N_2$. Ber. C 42,11, H 5,26, N 24,56.
Gef. „ 42,00, „ 5,43, „ 24,75.

Die Bildung des Körpers, von dem unten noch weiter die Rede sein wird, kann nicht verwundern, da er durch alkoholisches Ammoniak bereits von Körner und Menozzi aus Brombernsteinsäure

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 34, 452 [1901]. (*S. 193.*)
[2]) Gaz. chim. 17, 173.

bzw. Fumarsäureester und von Piutti[1]) aus Asparaginsäureäthylester erhalten wurde.

Schwieriger ist die Isolierung des Diamids; aus der wässerigen Lösung ließ es sich nicht wieder gewinnen. Dagegen gelangt man zum Ziele durch Auskochen des Rohproduktes mit reinem, trocknem Methylalkohol, worin das Imid ganz unlöslich ist. Wird die methylalkoholische Lösung unter stark vermindertem Druck bis zum Sirup eingeengt, so verwandelt sich der Rückstand in eine lockere, weiße Masse, deren Menge, auf den Asparaginsäureester berechnet, etwa 50% der Theorie beträgt. Dieses Produkt ist noch nicht ganz rein, denn es schmilzt etwa 12⁰ niedriger als die kristallisierte Substanz und ist außerdem hygroskopisch. Für die Gewinnung des kristallisierten Diamids ist es schwer eine bestimmte Vorschrift zu geben. Wie es scheint, ist Ausschluß von Feuchtigkeit eine Hauptbedingung. Es ist uns einige Male gelungen, den obenerwähnten Sirup durch bloßes Stehen im Exsikkator zu kristallisieren. Die Kristalle waren aber klein und schwach gelb gefärbt. Sie wurden von dem anhaftenden Sirup durch Pressen zwischen Papier befreit und für die Analyse 12 Stunden über Natronkalk getrocknet.

0,1316 g Sbst.: 37,3 ccm N (25⁰, 765 mm). — 0,1900 g Sbst.: 0,2573 g CO_2, 0,1172 g H_2O.

$C_4H_9N_3O_2$. Ber. C 36,64, H 6,87, N 32,06.
Gef. „ 36,92, „ 6,95, „ 31,82.

Die Kristalle schmolzen bei 131⁰ (korr.) und waren nicht hygroskopisch.

Das Diamid reagiert stark alkalisch, ist spielend leicht löslich in Wasser, sehr leicht löslich in heißem und ziemlich löslich in kaltem Methylalkohol, schwer löslich in Äthylalkohol, unlöslich in Äther, Chloroform und Benzol. Mit alkalischer Kupferlösung gibt es eine schöne Biuretfärbung.

Es gelang nicht, Salze des Diamides darzustellen. In wässeriger Lösung schied sich stets auf Zusatz von Säuren das betreffende Ammoniumsalz ab und in methylalkoholischer Lösung entstanden nicht kristallisierende Öle. Nur auf Zusatz von wenig konzentrierter Schwefelsäure bildete sich ein weißer Niederschlag, aus dessen Analyse aber keine Formel zu berechnen war.

Mit Quecksilberchlorid entsteht ein dicker, weißer Niederschlag, der beim Kochen sich zusammenballt und sich in nicht unerheblichem Maße in der heißen Flüssigkeit löst, aber beim Erkalten wieder herausfällt. Mit Phosphorwolframsäure entsteht ein dichter Niederschlag,

[1]) Gaz. chim. 18, 473.

welcher sich in der Wärme ziemlich leicht löst. Mit Ferrocyankalium gibt es in der verdünnten wässerigen Lösung keine Fällung. Mit Platinchlorwasserstoffsäure entstand nach mehrtägigem Stehen ein Niederschlag von Ammoniumchlorplatinat.

Das Diamid dreht in wässeriger oder in methylalkoholischer Lösung schwach nach links; die spezifische Drehung wurde ungefähr zu —7° gefunden, aber die Bestimmung ist wegen der leichten Zersetzlichkeit des Körpers nicht genau.

In der Tat nimmt die wässerige Lösung des Diamids schon bei gewöhnlicher Temperatur bald den Geruch des Ammoniaks an; rasch erfolgt die Zersetzung in der Wärme. Verdampft man z. B. die wässerige Lösung auf dem Wasserbade, so entweicht Ammoniak, und es bleibt ein braungefärbter, schmieriger Rückstand zurück, aus dem man durch Auslaugen mit Wasser das schwerlösliche Asparaginsäureimid isolieren kann; seine Menge ist aber relativ klein. Einfacher verläuft die Spaltung des Asparaginsäurediamids durch kaltes Barytwasser; es entsteht in reichlicher Menge *l*-Asparagin, wie folgender Versuch zeigt.

0,5 g Diamid wurden in 12 ccm Barytwasser, das 1 g kristallisiertes Barythydrat enthielt, bei Zimmertemperatur gelöst, nach 16-stündigem Stehen der Baryt durch Kohlensäure gefällt und das Filtrat im Vakuum verdunstet. Dabei schieden sich farblose Tafeln (0,35 g) ab, die mit natürlichem *l*-Asparagin identifiziert werden konnten.

0,3572 g Sbst. verloren bei 100° 0,0438 g H_2O.

$C_4H_8O_3N_2 + H_2O$. Ber. H_2O 12,00. Gef. H_2O 12,26.

Die so getrocknete Substanz wurde analysiert.

0,1527 g Sbst.: 0,2044 g CO_2, 0,0849 g H_2O. — 0,1450 g Sbst.: 25,7 ccm N (18°, 776 mm).

$C_4H_8O_3N_2$. Ber. C 36,36, H 6,06, N 21,22.
Gef. „ 36,50, „ 6,18, „ 20,88.

Die wässerige Lösung drehte das polarisierte Licht nach links.

2,5-Diacipiperazin-3,6-diessigsäurediäthylester,

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad NH.CO.\dot{C}H.CH_2.CO_2C_2H_5. \\ C_2H_5O_2C.CH_2.\dot{C}H.CO.\dot{N}H \end{array}$$

Die Verbindung entsteht in sehr geringer Menge bei der Destillation des Asparaginsäureesters unter stark vermindertem Druck und läßt sich aus dem braunen Rückstand durch Waschen mit Äther als weißes, kristallinisches Produkt gewinnen. Es gelang nicht, die Ausbeute durch höhere Temperatur und längeres Erhitzen zu verbessern,

denn es wird dann Ammoniak in großer Menge abgespalten und Fumarsäureester gebildet. Die besten Resultate gab folgendes Verfahren. Asparaginsäureester wird unter Zugabe von wenig Zinkchlorid bei 15 mm Druck 48 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Erkalten erstarrt die Flüssigkeit zu einer braunen, kristallinischen Masse. Sie wird durch Ausziehen mit viel Äther gereinigt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug 10% des Asparaginsäureesters oder 15% der Theorie. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Alkohol und dann aus Wasser blieb der Schmp. bei 179—180° (korr.) gewöhnlich konstant. Wir haben ihn aber noch 5° höher gefunden bei einem Präparat, das aus Asparaginsäureester in der Kälte dargestellt war. Das Schwanken des Schmelzpunktes ist vielleicht dadurch veranlaßt, daß man es mit wechselnden Gemischen von aktiver Substanz und Racemkörper zu tun hat. Zur Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1522 g Sbst.: 0,2796 g CO_2, 0,0893 g H_2O. — 0,1057 g Sbst.: 9,2 ccm N (25°, 763 mm).

$C_{12}H_{18}O_6N_2$. Ber. C 50,35, H 6,29, N 9,79.
Gef. „ 50,10, „ 6,52, „ 9,73.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts diente die Lösung in Eisessig.

Angewandte Menge Eisessig	Substanz	Depression	Molekulargewicht Ber.	Molekulargewicht Gef.
8 g	0,1725 g	0,30°	286	280
24 „	0,2067 „	0,125°		268
24 „	0,4964 „	0,295°		275
24 „	0,9229 „	0,55°		273

Der Ester ist in Wasser und Alkohol in der Wärme leicht löslich und kristallisiert aus beiden beim Erkalten in farblosen Nadeln. Er löst sich auch leicht in Eisessig, aber fast gar nicht in Äther. Die Lösung in Eisessig dreht das polarisierte Licht nach links. Durch Alkalien oder Barytwasser wird der Ester beim Kochen rasch verseift, aber auch weiter durch Zerstörung des Piperazinrings in Asparaginsäure zurückverwandelt. Milder verläuft die Wirkung des Barytwassers bei gewöhnlicher Temperatur.

Läßt man 1 g des Esters mit einer Lösung von 2 g kristallisiertem Barythydrat in 25 ccm Wasser 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, entfernt dann den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure und die Kohlensäure durch ganz gelindes Erwärmen im Vakuum, so enthält die Lösung ein Baryumsalz, das mit Silbernitrat einen farblosen, flockigen Niederschlag gibt. Wir vermuten, daß er das Silber-

salz der Diacipiperazindiessigsäure ist. Diese Annahme bedarf aber noch der Prüfung, da der Silbergehalt für die Formel $C_8H_8O_6N_2Ag_2$ etwas zu hoch war.

Asparaginimid.

Viel leichter als die Verseifung ist die Veränderung des Esters mit Ammoniak zu verfolgen, denn es bildet sich dabei das schwer lösliche sogenannte Asparaginimid, das wir, wie früher auseinandergesetzt wurde, für Diacipiperazindiessigsäurediamid halten:

$$\begin{array}{l} H_2NOC.CH_2.CH.CO.NH \\ \qquad\qquad\quad NH.CO.CH.CH_2.CONH_2 \end{array}.$$

Es genügt, den Ester mit flüssigem Ammoniak im geschlossenen Rohr bei gewöhnlicher Temperatur einige Tage liegen zu lassen. Die farblose Lösung färbt sich allmählich schwach gelb und scheidet das Diamid als kristallinische Masse ab. Nach drei Tagen ist die Reaktion beendet, und beim Verdunsten des Ammoniaks bleibt der Rest des Diamids als schwach gelbliche Masse zurück. Die Ausbeute betrug fast 90% der Theorie. Für die Analyse wurde aus heißem Wasser umkristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1830 g Sbst.: 0,2832 g CO_2, 0,0886 g H_2O. — 0,1506 g Sbst.: 32,3 ccm N (22°, 762 mm).

$C_4H_6O_2N_2$. Ber. C 42,11, H 5,26, N 24,56.
Gef. „ 42,20, „ 5,38, „ 24,36.

Ebenso wie der Ester wird das Diamid durch Barytwasser verseift. Als 2 g mit einer Lösung von 4 g kristallisiertem Barythydrat in 50 g Wasser 14 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt wurden, entstand eine klare Lösung, aus der sich nach Entfernen des überschüssigen Baryts und der Kohlensäure ein farbloses Silbersalz gewinnen ließ, welches wahrscheinlich das Derivat der Diacipiperazindiessigsäure war.

0,1436 g Sbst.: 0,0716 g Ag.

$C_8H_8O_6N_2Ag_2$. Ber. Ag 48,67. Gef. Ag 49,86.

33. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 38, 605 [1905].
(Eingegangen am 21. Januar.)

Am Schlusse der vierten Mitteilung[1]) ist kurz eine neue Methode für den Aufbau von Polypeptiden erwähnt, welche es gestattet, die Kette der Aminosäuren auf der Seite des Carboxyls zu verlängern. Ist nämlich die Aminogruppe durch Einführung eines halogenhaltigen Säureradikals geschützt, so läßt sich durch Chlorphosphor das Carboxyl in die Säurechloridgruppe verwandeln, und das Chlorid kann dann mit Aminosäureestern kombiniert werden. Die Reaktion wurde aufgefunden bei dem *a*-Bromisocapronylglycin, dessen Chlorid mit Glykocollester nach folgender Gleichung zusammentritt:

$$C_4H_9.CHBr.CO.NH.CH_2.CO.Cl + 2\,NH_2.CH_2.CO_2C_2H_5$$
$$= HCl.NH_2.CH_2.CO_2C_2H_5 + C_4H_9.CHBr.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.CO_2C_2H_5\,.$$

Dieser Ester kann dann durch Verseifung und nachfolgende Behandlung mit Ammoniak in Leucylglycylglycin verwandelt werden.

Ich habe das Verfahren jetzt an neuen Beispielen geprüft. Dabei hat sich herausgestellt, daß die experimentelle Ausführung der Reaktion allerdings eine subtile Arbeit ist, daß diese aber trotzdem gewiß in manchen Fällen mit Vorteil für die Synthese von Polypeptiden benutzt werden kann.

Die Bildung des Säurechlorids ist auch bei komplizierteren Systemen noch möglich, wie das Verhalten des α-Bromisocapronylglycylglycins zeigt, und die Kombination seines Chlorids mit Glycinester führt weiter zum α-Bromisocapronyldiglycylglycinester, aus dem durch Verseifung und Behandlung mit Ammoniak das entsprechende Tetrapeptid entsteht. Daß man ferner bei dem Verfahren an Stelle des einfachen Glycinesters auch Polypeptidester verwenden kann, lehrt die Kombination von α-Bromisocapronylglycinchlorid mit Glycyl-

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 3070 [1904]. (*S. 377.*)

glycinester, wobei der gleiche α-Bromisocapronyldiglycylglycinester resultiert.

Nach diesen Erfahrungen lag es nahe, dieselbe Reaktion auf andere Acylderivate der Aminosäuren, z. B. die Benzoylkörper, zu übertragen. Die Wechselwirkung zwischen Hippursäure und Phosphorpentachlorid ist wiederholt Gegenstand der Untersuchung gewesen, ohne daß es gelungen wäre, das gesuchte Hippurylchlorid, $C_6H_5.CO.NH.CH_2.CO.Cl$, zu gewinnen. Ich war deshalb überrascht, daß die Darstellung dieses Körpers durch Schütteln von fein gepulverter Hippursäure mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid außerordentlich leicht ausgeführt werden kann. Das Produkt selbst ist ein schön kristallisierter Körper, dessen Verwandlung in Ester, Amid und ähnliche Derivate sich mit größter Leichtigkeit vollzieht. Fast ebenso gut läßt sich das Chlorid mit den Estern der Aminosäuren oder mit der alkalischen Lösung der letzteren in Reaktion bringen, wie ich an seiner Verwandlung in Benzoylglycylglycin zeigen werde. Dieses kann wiederum durch Phosphorpentachlorid in das Chlorid und durch nachträgliche Behandlung mit Glycinester in Benzoyldiglycylglycinester übergeführt werden. So lassen sich mithin dieselben Benzoylkörper gewinnen, die Th. Curtius und seine Schüler mit Hilfe der Azide dargestellt haben[1]).

Durch solche Erfolge ermutigt, habe ich endlich nochmals das Verhalten der freien Aminosäuren gegen Chlorphosphor geprüft und gefunden, daß hier beim Schütteln mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid kristallinische Produkte entstehen, die als Hydrochlorate der Aminosäurechloride von der allgemeinen Formel

$$\begin{array}{l} R.CH.COCl \\ \quad \cdot \\ \quad NH_3Cl \end{array}$$

betrachtet werden können.

Analysiert wurden bisher die Derivate des racemischen Alanins, Leucins und der α-Aminobuttersäure. Für Glykocoll, das ein etwas abweichendes Verhalten zeigt, sind die Versuche noch nicht abgeschlossen. Genauer studiert sind die Umsetzungen beim salzsauren Leucylchlorid Es löst sich in Wasser unter Bildung von salzsaurem Leucin, und mit Alkohol erzeugt es Leucinester. Ferner liefert es, mit Glycinester kombiniert, reichliche Mengen von Leucylglycinester bzw. Leucylglycinanhydrid.

Wenn diese Reaktion sich verallgemeinern läßt, so ist sie eine überaus wertvolle Erweiterung der Polypeptidsynthese; denn es wird dadurch möglich, die optisch-aktiven Spaltprodukte der Proteïnstoffe direkt in mannigfaltigster Weise zu verkuppeln.

---

[1]) Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 57 [1904].

Der Aufbau der Polypeptide ist mit Hinblick auf die natürlichen Proteïne ein so vielgestaltiges Problem, daß es ohne Zweifel noch einer ganzen Reihe von Methoden bedarf, um alle wünschenswerten Möglichkeiten zu verwirklichen. Aus diesem Grunde wird auch noch ein anderes neues Verfahren von Wert sein, Dipeptide bequem darzustellen, das darin besteht, die Diacipiperazine durch Alkali aufzuspalten. Früher habe ich die Verwandlung durch Kochen mit Säuren ausgeführt; bequemer gelingt sie, wenigstens bei den einfachen Gliedern der Klasse, durch kaltes, verdünntes Alkali. Wird z. B. fein gepulvertes Glycinanhydrid mit der äquimolekularen Menge Normalnatronlauge bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt, so geht es bald in Lösung und verwandelt sich dabei in das Alkalisalz des Glycylglycins. Wird dann die Lösung mit Säurechloriden, wie Benzoylchlorid oder Bromisocapronylchlorid, geschüttelt, so entstehen in sehr befriedigender Ausbeute die entsprechenden Acylderivate, das Benzoylglycylglycin und das Bromisocapronylglycylglycin, deren praktische Darstellung dadurch viel bequemer wird.

Diese überraschend leichte Aufspaltung des Diacipiperazinrings durch verdünntes, kaltes Alkali gibt auch einen neuen Gesichtspunkt für das Studium der Proteïnstoffe. Denn ihre vollständige Hydrolyse durch Fermente in schwach alkalischer Lösung bis zu den einfachen Aminosäuren kann jetzt nicht mehr als Grund gegen die Annahme von Diacipiperazinringen im Molekül angesehen werden.

Da diese Ringe bei den künstlichen Polypeptiden so leicht entstehen, so halte ich es vielmehr für wahrscheinlich, daß sie auch in manchen natürlichen Proteïnstoffen vorhanden sind. Möglicherweise spielen sie bei der Denaturierung der genuinen Eiweißkörper und bei der Bildung der Alkalialbuminate eine Rolle. Ich bemerke aber ausdrücklich, daß bisher der stichhaltige Beweis für die Anwesenheit dieser Gruppe fehlt; denn die wiederholt behauptete Bildung von Leucinimid bei der Spaltung von Eiweißkörpern durch Säuren oder Fermente ist nach Beobachtungen im hiesigen Institut recht zweifelhaft.

Aufspaltung des Glycinanhydrids durch Alkali.

Wird 1 g gepulvertes Glycinanhydrid mit 10 ccm Normalnatronlauge (berechnet für 1 Mol. 8,8 ccm) bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt, so geht es rasch in Lösung, und nach 15—20 Minuten ist die Verwandlung in Glycylglycin vollzogen. Neutralisiert man jetzt mit 10 ccm Normalsalzsäure und verdampft die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck auf einige Kubikzentimeter, so scheidet sich das Glycylglycin als farblose Kristallmasse ab. Isoliert wurden von dem

reinen Präparat 0,6 g; seine Menge ist aber jedenfalls viel größer, wie die späteren Beobachtungen zeigen; nur ist es nicht möglich, es aus der kochsalzhaltigen Mutterlauge völlig zu isolieren. Für die praktische Darstellung des Glycylglycins ist das Verfahren ungefähr gleichwertig mit der früher beschriebenen Aufspaltung durch Salzsäure. Außerordentlich viel bequemer wird aber die Methode, wenn es sich um die Gewinnung von Acylderivaten des Dipeptids handelt.

Neue Darstellung von α-Bromisocapronyl-glycyl-glycin[1]).

15 g fein gepulvertes Glycinanhydrid werden mit 150 ccm Normal-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur bis zur völligen Lösung geschüttelt, was nach 10—15 Minuten der Fall ist. Dann läßt man die Flüssigkeit noch etwa 15 Minuten stehen, kühlt auf ungefähr 0° ab und trägt nun im Laufe einer halben Stunde unter kräftigem Schütteln in kleinen Portionen abwechselnd 33 g α-Bromisocapronylchlorid ($1^1/_8$ Mol.) und 225 ccm Normal-Natronlauge ein, so daß die Flüssigkeit stets alkalisch ist; zum Schluß wird die klare Lösung mit Salzsäure übersättigt, das ausgeschiedene Bromisocapronylglycylglycin abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen, dann im Vakuumexsikkator getrocknet und zur Entfernung kleiner Mengen Bromisocapronsäure mit Petroläther ausgelaugt. Die Ausbeute betrug 36,2 g oder 89% der Theorie, berechnet auf das angewandte Glycinanhydrid. Zur völligen Reinigung genügt einmaliges Umkristallisieren aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle, wobei allerdings ungefähr $^1/_4$ in der Mutterlauge bleibt.

Neue Darstellung des Benzoyl-glycyl-glycins[2]).

5 g Glycinanhydrid wurden, wie zuvor, mit 50 ccm Normal-Natronlauge aufgespalten, dann stark abgekühlt und dazu im Laufe einer halben Stunde unter Schütteln abwechselnd 7,5 g Benzoylchlorid (ca. $1^1/_4$ Mol.) und 65 ccm Normal-Natronlauge zugegeben. Die schließlich filtrierte alkalische Flüssigkeit gab beim Übersättigen mit Salzsäure einen kristallinischen Niederschlag, der nach einstündigem Stehen bei 0° abgesaugt und zuerst mit kaltem Wasser, dann zur Entfernung der Benzoësäure mit Äther gewaschen wurde. Zur Reinigung wurde das Produkt aus der 15-fachen Menge kochendem Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 10 g und an reinem Präparat 8 g oder 77% der Theorie, berechnet auf das Glycinanhydrid. Das Präparat schmolz bei 208° (korr.), während Curtius 206,5° angibt.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2989 [1903]. (*S. 333.*)
[2]) Curtius, Journ. für prakt. Chem. [2] **26**, 175 und [2] **70**, 76.

0,1676 g Sbst.: 17,3 ccm N (17°, 749 mm).

$C_{11}H_{12}O_4N_2$. Ber. N 11,90. Gef. N 11,83.

Da das Glycinanhydrid leicht zu bereiten ist, so halte ich diese Darstellungsweise für bequemer als die von Curtius angegebene. Noch besser aber dürfte die später beschriebene Gewinnung aus Hippurylchlorid und Glykocoll sein.

Ähnlich dem Glycinanhydrid wird das Alaninanhydrid von verdünntem Alkali aufgespalten. Schüttelt man 1 g fein gepulvertes Anhydrid mit einem Gemisch von 8 ccm Normal-Natronlauge und 12 ccm Wasser bei Zimmertemperatur, so tritt bald klare Lösung ein, und nach mehrstündigem Stehen ist die Verwandlung in das Dipeptid vollzogen. Das hierbei entstehende Alanylalanin ist bisher nur in Form seines Carbäthoxylester-Derivats[1]) isoliert worden. Ebenso leicht wie dieses lassen sich aber auch seine Kombinationon mit halogenhaltigen Säureresten darstellen. So hat Hr. Dr. Kautzsch im hiesigen Institut aus der alkalischen Lösung durch Einwirkung von Brompropionylbromid und α-Bromisocapronylchlorid kristallinische Produkte von der erwarteten Zusammensetzung in reichlicher Ausbeute gewonnen. Von dem α-Bromisocapronylalanylalanin konnten sogar zwei Isomere isoliert werden, und es unterliegt keinem Zweifel, daß man auf diesem Wege noch zahlreiche Polypeptide des Alanylalanins erhalten kann. Wählt man für die Aufspaltung des Alaninanhydrids die Natronlauge konzentrierter als zuvor angegeben, schüttelt man z. B. das Anhydrid mit der oben angegebenen Menge Lauge ohne Wasserzusatz, so findet zwar auch vorübergehend Lösung statt, aber fast unmittelbar hinterher scheidet sich ein kristallinisches Natriumsalz ab, das aus wenig warmem Wasser oder Alkohol in äußerst feinen Nädelchen kristallisiert. Ganz ähnlich ist die entsprechende Kaliumverbindung. Ob diese Körper Salze des Alaninanhydrids oder des Alanylalanins sind, bleibt noch zu entscheiden.

Viel beständiger ist das Leucinimid gegen Alkalien. Von kalten wässerigen Laugen wird es auch beim stundenlangen Schütteln kaum angegriffen, woran allerdings auch seine sehr geringe Löslichkeit in kaltem Wasser schuld sein kann. Aber selbst in warmer, alkoholischer Lösung erfolgt der Angriff der Alkalien sehr langsam, so daß die Methode hier keinen Wert hat.

Die Aufspaltung des Diacipiperazinringes wird also in auffallender Weise durch die Natur der damit verbundenen Alkyle beeinflußt, und es scheint hier ein neuer Fall von sog. sterischer Hinderung vorzuliegen, der eine ausführlichere Untersuchung verdient.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 1103 [1902]. (*S. 299.*)

α-Bromisocapronyl-diglycyl-glycinester,

$C_4H_9.CHBr.CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO_2C_2H_5$.

Zur Gewinnung dieser Verbindung aus dem α-Bromisocapronylglycylglycin werden 2 g fein gepulvert, gesiebt, mit 30 ccm frisch destilliertem Acetylchlorid übergossen und nach dem Abkühlen in Eiswasser in 3 Portionen 2 g frisches und rasch gepulvertes Phosphorpentachlorid unter tüchtigem Schütteln und häufigem Abkühlen zugegeben. Die Operation dauert 15—20 Minuten. Phosphorpentachlorid und Bromisocapronylglycylglycin lösen sich dabei bis auf eine geringe Menge von kleinen, glitzernden Kriställchen, und die Flüssigkeit nimmt eine schwach gelbe Farbe an. Sie wird, ohne zuvor filtriert zu sein, unter einem Druck von 0,5 mm und unter gleichzeitiger Kühlung mit Eiswasser rasch verdunstet. Dabei scheidet sich eine feste, zum Teil kristallinische Masse ab. Um die letzten Reste von Acetylchlorid und Phosphoroxychlorid zu entfernen, wird sie mit Petroläther ausgelaugt, die Flüssigkeit abgegossen, der Rückstand (2 g) rasch und bei möglichstem Ausschluß von Feuchtigkeit abfiltriert und sofort in eine verdünnte, ätherische Lösung (4-proz.) von überschüssigem Glykocollester eingetragen. Nach $1^1/_2$-stündigem Schütteln auf der Maschine ist die Umsetzung beendet, und die ungelöste Masse ein Gemisch von α-Bromisocapronyldiglycylglycinester und salzsaurem Glykocollester. Letzterer wird nach dem Absaugen und Waschen mit Äther durch Auslaugen mit wenig kaltem Wasser entfernt. Die Ausbeute an Bromisocapronyldiglycylglycinester betrug gewöhnlich 0,75 g oder 29% der Theorie. Zur völligen Reinigung wurde der Ester aus ungefähr der 65-fachen Menge kochenden Wassers unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert und zur Analyse im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1948 g Sbst.: 17,4 ccm N (17°, 778,5 mm). — 0,1118 g Sbst.: 0,0536 g AgBr.

$C_{14}H_{24}O_5N_3Br$. Ber. N 10,68, Br 20,28.

Gef. „ 10,69, „ 20,40.

Die Substanz schmilzt bei 181° (korr. 184,5°) unter schwacher Gelbfärbung. Sie kristallisiert aus heißem Wasser in feinen, knollenartigen Aggregaten und aus heißem Alkohol, worin sie viel leichter löslich ist, in feinen, büschel- oder sternförmig angeordneten Nadeln.

Viel bequemer als das zuvor beschriebene Verfahren ist die Darstellung des Esters aus Bromisocapronyl-glycin und Glycylglycinester.

5 g gepulvertes α-Bromisocapronylglycin werden mit 30 ccm frischem Acetylchlorid übergossen und nach Zusatz von 5 g zerkleinertem Phosphorpentachlorid bei gewöhnlicher Temperatur 10—15 Minuten ge-

schüttelt, bis klare Lösung erfolgt ist, und dann die Flüssigkeit unter 0,5 mm Druck und gleichzeitiger Kühlung mit Eiswasser rasch verdampft. Den hierbei bleibenden, ganz schwach gefärbten Sirup schüttelt man zuerst kräftig mit Petroläther, um den Rest des Phosphoroxychlorids möglichst zu entfernen, gießt den Petroläther ab, wiederholt diese Operation und löst schließlich den Rückstand in trockenem Äther. Die ätherische Lösung wird ziemlich rasch eingetropft in eine mit Eis gekühlte und bewegte Chloroformlösung von Glycylglycinester (ca. 75 ccm), die aus 12 g Hydrochlorat in der früher beschriebenen Weise[1]) gewonnen ist. Die Mischung trübt sich anfangs nur, zum Schluß der Operation beginnt die Abscheidung von Kristallen. Man läßt 12 Stunden stehen, wobei eine reichliche Abscheidung eines fast farblosen, kristallinischen Niederschlages erfolgt. Er wird filtriert und mit Äther gewaschen. Seine Menge betrug 11 g, und nach dem Auslaugen mit kaltem Wasser, wodurch der beigemengte Glycylglycinester gelöst wird, fast 8 g. Diese gaben beim Umkristallisieren aus 400 ccm heißem Wasser 5,4 g, und aus der Mutterlauge wurden noch 1,1 g gewonnen. Die Gesamtausbeute an fast reinem Produkt war deshalb mehr als 80% der Theorie. Schmp. 181^0 (unkorr.).

0,1937 g Sbst.: 0,3053 g CO_2, 0,1095 g H_2O.

$C_{14}H_{24}O_5N_3Br$. Ber. C 42,61, H 6,13.
Gef. „ 42,90, „ 6,32.

α-Bromisocapronyl-diglycyl-glycin.

$C_4H_9.CHBr.CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NHCH_2COOH$.

5 g Ester werden gepulvert und mit einem Gemisch von 14 ccm Normal-Natronlauge und 20 ccm Wasser 3 Stunden auf der Maschine bei gewöhnlicher Temperatur bis zur Lösung geschüttelt. Wird dann die Flüssigkeit mit 3 ccm 5-fach Normal-Salzsäure versetzt, so beginnt nach einiger Zeit die Abscheidung des Bromisocapronyldiglycylglycins. Man läßt 12 Stunden bei 0^0 stehen und saugt ab. Die Ausbeute beträgt ungefähr 75% des angewandten Esters. Zur Analyse wurde aus warmem Alkohol, worin die Verbindung ziemlich leicht löslich ist, umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1841 g Sbst.: 0,2678 g CO_2, 0,0920 g H_2O.

$C_{12}H_{20}O_5N_3Br$. Ber. C 39,32, H 5,50.
Gef. „ 39,60, „ 5,59.

Die Substanz schmilzt bei 165^0 (korr. 168^0) und färbt sich dabei schwach braun.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 2872 [1901]. (*S. 283.*)

In heißem Wasser ist sie leicht löslich und scheidet sich beim Erkalten ziemlich langsam als sehr feine, kristallinische Masse ab.

Aus Alkohol kristallisiert sie in sehr feinen Nädelchen, die meist zu kugelförmigen Aggregaten vereinigt sind. Ebenso kristallisiert sie aus warmem Aceton, worin sie ziemlich schwer löslich ist. Von Äther, Chloroform wird sie recht schwer aufgenommen.

Leucyl-diglycyl-glycin, $C_4H_9.CH(NH_2).CO[NHCH_2CO]_2.NHCH_2COOH$.

Löst man 1 g der vorhergehenden Säure in 5 ccm Ammoniak von 25% und läßt bei Zimmertemperatur einige Tage stehen, so ist alles Halogen abgespalten und in der Flüssigkeit ein Niederschlag von äußerst feinen, mikroskopischen Nädelchen entstanden. Da die Flüssigkeit sich beim Eindampfen auf dem Wasserbade gelb färbt und bei der Vakuumdestillation sehr schäumt, so läßt man sie am besten im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure verdunsten. Die zurückbleibende gummiartige Masse löst sich in wenig Alkohol bei gelindem Erwärmen auf. Fügt man aber mehr absoluten Alkohol zu und erwärmt stärker, so beginnt bald die Kristallisation des Tetrapeptids in äußerst feinen, meist kugelförmig vereinigten Nädelchen. Man läßt bei gewöhnlicher Temperatur 1 bis 2 Stunden stehen und saugt ab. Zur Reinigung löst man in sehr wenig Wasser und wiederholt die Abscheidung mit Alkohol in der gleichen Art, bis das Produkt ganz frei von Bromwasserstoff ist. Die Ausbeute an reinem Tetrapeptid betrug ca. 55% der Theorie. Für die Analyse war über Schwefelsäure getrocknet.

0,1524 g Sbst.: 0,2647 g CO_2, 0,1007 g H_2O.

$C_{12}H_{22}O_5N_4$. Ber. C 47,63, H 7,32.

Gef. „ 47,37, „ 7,39.

Beim raschen Erhitzen fängt die Verbindung bei 215° an, sich dunkel zu färben; erhitzt man schnell weiter, so schmilzt sie gegen 228° (korr. 233°) zu einer tiefdunklen Flüssigkeit. In Wasser ist sie sehr leicht, in Alkohol aber sehr schwer löslich. Mit Alkali und wenig Kupfervitriol zeigt sie schöne Biuretfärbung.

Hippurylchlorid, $C_6H_5CO.NH.CH_2.COCl$.

Die Verwandlung der Hippursäure in ihr Chlorid vollzieht sich beim Schütteln mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid bei gewöhnlicher Temperatur recht glatt. Da aber sowohl das Ausgangsmaterial wie das Endprodukt recht schwer löslich sind, so ist es für

die völlige Umwandlung erforderlich, ersteres sehr fein zu pulvern und am besten durch ein Haarsieb zu treiben.

Schüttelt man 1 Teil so vorbereitete trockne Hippursäure mit 10 Teilen frischem Acetylchlorid und 1,3 Teilen grob gepulvertem Phosphorpentachlorid bei gewöhnlicher Temperatur, so geht ein kleiner Teil in Lösung, aber bald nachher scheidet sich das Hippurchlorid als dicker Brei ab, der sich bei weiterem Schütteln in ein schönes schweres Kristallpulver verwandelt. Zur Umwandlung aller Hippursäure ist natürlich längeres Schütteln nötig; bei größeren Mengen wurde deshalb im wohlverschlossenem Gefäß 1 Stunde auf der Maschine geschüttelt. Nach dieser Zeit ist der allergrößte Teil des Hippurchlorids als farblose Kristallmasse abgeschieden, die unter möglichstem Ausschluß von Feuchtigkeit abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid vom Lösungsmittel befreit wird. Die Ausbeute beträgt etwa 80% der Hippursäure. Aus der Acetylchlorid-Mutterlauge läßt sich durch starkes Abkühlen oder auch durch rasches Verdampfen unter sehr geringem Druck eine zweite, aber viel kleinere Kristallisation erzielen. Bleibt die Mutterlauge längere Zeit stehen, oder wird sie erhitzt, so nimmt sie eine immer stärker werdende gelbe Farbe an.

0,5274 g Sbst.: 0,3802 g AgCl. — 0,1886 g Sbst.: 12,2 ccm N (22° 746 mm).

$C_9H_8O_2NCl$. Ber. Cl 17,95, N 7,12.

Gef. „ 17,82, „ 7,22.

Aus warmem Acetylchlorid läßt sich das Chlorid umkristallisieren, nur darf das Erhitzen nicht lange dauern, da sonst Gelbfärbung eintritt. Es kristallisiert daraus in feinen farblosen Nadeln. Aus Benzol und Toluol läßt es sich ebenfalls umlösen. In Petroläther ist es so gut wie unlöslich. In luftdicht schließenden Gefäßen zeigt es auch bei wochenlangem Aufbewahren im Licht keine Veränderung. Im Kapillarrohr erhitzt, fängt es gegen 125° an, sich gelb zu färben, wird dann dunkelrot und schmilzt bei etwas höherer Temperatur, natürlich nicht konstant. Gegen Wasser ist es sehr empfindlich; infolgedessen riecht das in feuchter Luft aufbewahrte Präparat stark nach Salzsäure. In Wasser löst es sich sofort und bildet Hippursäure. Ebenso leicht wird es von Alkohol in Hippursäureester verwandelt. Wie glatt der Prozeß sich vollzieht, zeigt folgender Versuch:

4 g möglichst frisches Chlorid wurden in 15 ccm absolutem Alkohol eingetragen, wobei ziemlich starke Erwärmung stattfand. Beim Verdünnen mit Wasser fiel der Hippursäureester als Öl aus, das ausgeäthert wurde. Nach dem Trocknen mit Kaliumcarbonat wurde der ätherische Auszug verdampft, der Rückstand wieder in wenig Äther gelöst und der Hippursäureester durch Zusatz von Petroläther zur Kri-

stallisation gebracht. Die schönen, farblosen Nadeln schmolzen bei 67,5° und die Ausbeute betrug 4 g oder 95% der Theorie.

Verwandlung des Hippurylchlorids in Hippuramid.

Trägt man das Chlorid in eine gesättigte und mit Eis gekühlte, ätherische Lösung von Ammoniak unter kräftigem Schütteln ein und ersetzt das verbrauchte Ammoniak durch Einleiten von neuem trocknem Gas, so erfolgt keine Lösung, da an die Stelle des Chlorids ein Gemisch von Chlorammonium und Hippuramid tritt. Letzteres läßt sich durch Kristallisation des Rohproduktes aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle reinigen. Die Ausbeute war befriedigend. Das Präparat zeigte den Schmp. 183°.

0,1823 g Sbst.: 0,4027 g CO_2, 0,0920 g H_2O. — 0,1592 g Sbst.: 21,2 ccm N (14°, 768,5 mm).

$C_9H_{10}O_2N_2$. Ber. C 60,62, H 5,66, N 15,70.
Gef. „ 60,25, „ 5,64, „ 15,87.

Verwandlung des Hippurylchlorids in Benzoyl-glycyl-glycin.

Die Kuppelung kann sowohl mit Glykocollester in ätherischer Lösung, wie mit Glykocoll in alkalischer Lösung ausgeführt werden.

Im ersten Falle wird das Hippurylchlorid in eine abgekühlte und stark verdünnte, ätherische Lösung von überschüssigem Glykocollester (mehr als 2 Mol.) eingetragen und das Gemisch $^1/_2$ Stunde kräftig geschüttelt. Die ausgeschiedene Kristallmasse ist ein Gemisch von salzsaurem Glykocollester und Benzoylglycylglycinester. Sie wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Ammoniak ausgelaugt und der übrig gebliebene Teil aus der ungefähr 20-fachen Menge Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert. Im Vakuum getrocknet, zeigte das Produkt den von Curtius[1]) für den Benzoylglycylglycinester angegebenen Schmp. 117° und die Zusammensetzung $C_{13}H_{16}O_4N_2$.

0,1929 g Sbst.: 0,4171 g CO_2, 0,1049 g H_2O. — 0,1683 g Sbst.: 0,3632 g CO_2, 0,0946 g H_2O. — 0,1923 g Sbst.: 16,9 ccm N (13°, 761 mm).

$C_{13}H_{16}O_4N_2$. Ber. C 59,04, H 6,06, N 10,63.
Gef. „ 58,97, 58,86, „ 6,08, 6,29, „ 10,41.

Um das Hippurylchlorid direkt mit Glykocoll zu kuppeln, löst man 1 Teil des letzteren in 13,5 ccm Normal-Natronlauge, kühlt auf 0° ab und fügt dazu abwechselnd in kleinen Portionen und im Laufe von $^1/_2$ Stunde unter kräftigem Schütteln 2 g Hippurylchlorid und 14 ccm Normal-Natronlauge. Das Chlorid verschwindet beim Umschütteln sehr

[1]) Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 78 [1904].

rasch. Wenn schließlich die alkalische Lösung angesäuert wird, fällt das Benzoylglycylglycin als kristallinischer Niederschlag aus, der durch Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle leicht zu reinigen ist. Die Ausbeute an reinem Präparat betrug 1,2 g oder 50% der Theorie, berechnet auf das angewandte Hippurylchlorid. Schmp. 206° (Curtius fand 206,5°)[1]).

0,1963 g Sbst.: 20,3 ccm N (18°, 749 mm).

$C_{11}H_{12}O_4N_2$. Ber. N 11,89. Gef. N 11,81.

Verwandlung des Benzoyl-glycyl-glycins in Benzoyl-diglycyl-glycinester.

Werden 2 g fein gepulvertes Benzoylglycylglycin mit 30 ccm frischem Acetylchlorid übergossen, auf 0° abgekühlt und nach Zusatz von 2,8 g zerkleinertem Phosphorpentachlorid kräftig geschüttelt, so geht der größere Teil in Lösung. Verdampft man dann das schwach gelbe Filtrat möglichst rasch, bei weniger als 0,5 mm Druck, so bleibt ein anfangs gelber, fester Rückstand, der sich bei Zutritt von Luft bald rot färbt. Er muß deshalb stets in Eiswasser gekühlt bleiben und möglichst rasch durch Waschen mit Petroläther von dem anhaftenden Lösungsmittel befreit werden. Man löst dann sofort in kaltem Chloroform und tropft in eine verdünnte und gekühlte ätherische Lösung von überschüssigem Glykocollester unter Schütteln ein.

Der hierbei entstehende dicke Niederschlag wird abgesaugt, mit Äther gewaschen, abgepreßt und mit kaltem Wasser ausgelaugt. Der Rückstand wog 1,1 g und war schwach gelbrot gefärbt. Er wurde in ziemlich wenig heißem Wasser gelöst und die Lösung mit Tierkohle entfärbt. Aus dem Filtrat schied sich beim Erkalten der Benzoyldiglycylglycinester in feinen, farblosen Nadeln ab, die den von Curtius[2]) angegebenen Schmp. 173° (unkorr.) zeigten.

0,1550 g Sbst.: 17,4 ccm N (18°, 765 mm).

$C_{15}H_{19}O_5N_3$. Ber. N 13,11. Gef. N 13,08.

Die Ausbeute war allerdings wenig befriedigend.

Salzsaures Leucylchlorid, $C_4H_9.CH(NH_3Cl).COCl$.

Für die folgenden Versuche diente reines, synthetisches, inaktives Leucin, das sorgfältig gepulvert, durch ein feines Sieb getrieben und völlig getrocknet war. 5 g wurden mit 100 ccm frischem Acetylchlorid in einem Glaszylinder von 200 ccm mit gut schließendem Glasstöpsel

[1]) Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 77 [1904].
[2]) Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 82 [1904].

übergossen, abgekühlt, dann 8 g (1 Mol.) frisches und rasch zerkleinertes Phosphorpentachlorid zugegeben und 2 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur auf der Maschine geschüttelt. Der Chlorphosphor verschwindet dabei völlig, und die Aminosäure verwandelt sich in das salzsaure Chlorid, das die Flüssigkeit als sehr feiner, dicker, aber kristallinischer Brei erfüllt. Will man ganz sicher sein, daß das Präparat kein unverändertes Leucin mehr enthält, wie es bei dem Analysenmaterial nötig ist, so tut man gut, jetzt nochmals 1,5 g zerkleinertes Phosphorpentachlorid zuzufügen und abermals eine Stunde zu schütteln, wobei das Pentachlorid völlig in Lösung geht und allerdings auch ein kleiner Verlust an Leucylchlorid eintritt. Zur Isolierung des Produktes ist nur noch Filtration und Auswaschen mit Acetylchlorid und Petroläther nötig. Dabei muß aber Feuchtigkeit völlig ausgeschlossen sein.

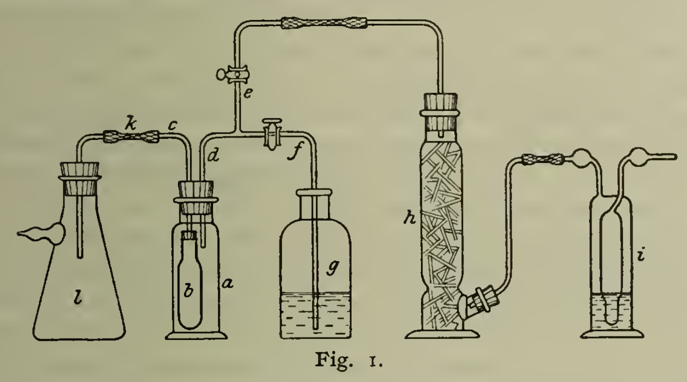


Fig. 1.

Da die sehr lockere Masse wegen Verstopfung des Filters schlecht zu filtrieren ist, so haben nicht allein die gewöhnlichen Filtrationsvorrichtungen, sondern auch der von Beckmann und Paul[1]) für ähnliche Zwecke angegebene Apparat hier versagt. Vorzügliche Resultate erhielt ich dagegen mit den bekannten, von Pukall empfohlenen Tonfiltern und dem beistehenden Apparat, für dessen Zeichnung ich Herrn Dr. O. Diels zu Dank verpflichtet bin.

a ist der Stöpselzylinder, in welchem die Reaktion vorgenommen wurde, und *b* der Tonzylinder, in den mittels eines Gummistopfens das Rohr *c*, das fast bis zum Boden reicht, eingesetzt ist. Die Flasche *a* ist mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen, durch den einerseits das Rohr *c* und andererseits das Rohr *d* durchgehen. *d* verzweigt sich in *e* und *f*, die beide mit Glashähnen versehen sind; *f* dient dazu, die Waschflüssigkeit aus der Flasche *g* zu entnehmen *e* führt zu dem mit Phosphorsäureanhydrid gefüllten Turm *h* und der

[1]) Ann. d. Chem. **266**, 4 [1891].

mit Schwefelsäure gefüllten Flasche *i*, die dazu dienen, einen trocknen Luftstrom in *a* hineinzuleiten. Das Rohr *c* steht durch den Gummischlauch *k* mit der Saugflasche *l* in Verbindung. Wird bei *l* evakuiert, so geht die in der Flasche *a* enthaltene Flüssigkeit durch die Tonzelle und das Rohr *c* dorthin. Gleichzeitig läßt man durch *e* einen langsamen, getrockneten Luftstrom in das Gefäß eintreten. Der größte Teil des Niederschlags setzt sich fest an die Tonzelle an. Um zu waschen, schließt man den Hahn bei *e* und öffnet bei *f*, worauf die Waschflüssigkeit aus der Flasche *g* nach *a* übertritt. *g* enthält frisches Acetylchlorid, sie wird später durch eine andere mit Petroläther, der über Phosphorsäureanhydrid getrocknet ist, ersetzt. Damit das Übersteigen der Waschflüssigkeit erleichtert wird, ist es ratsam, die Flasche *a*, in der bei der hohen Tension der verwendeten Flüssigkeit nur sehr geringer Minderdruck herrscht, durch Einstellen in eine Kältemischung oder durch Aufspritzen von Äther momentan abzukühlen. Noch bequemer wird die Operation, wenn in die Flasche *a*, ein drittes, in der Zeichnung fehlendes Rohr mit Hahn einmündet, das direkt mit der Saugpumpe verbunden werden kann. Einmaliges Waschen mit soviel Acetylchlorid, daß die Flasche *a* bis zur Höhe des Niederschlags damit gefüllt ist, und zweimaliges Waschen mit der gleichen Menge Petroläther genügten, um ein analysenreines Präparat zu gewinnen. Zum Schluß wird scharf abgesogen unter gleichzeitigem Zutritt des getrockneten Luftstromes, dann der Niederschlag möglichst rasch in einen mit Phosphorpentoxyd beschickten Vakuumexsikkator übergeführt und hier etwa 1 Stunde zur Entfernung der letzten Reste des Petroläthers getrocknet. Das Verfahren ist wohl für manche ähnliche Fälle verwendbar. Selbstverständlich läßt sich hier auch die von Beckmann und Paul angegebene Waschvorrichtung anbringen, wenn man es mit Flüssigkeiten zu tun hat, die nicht wie Acetylchlorid Kautschukschläuche angreifen, oder wenn man mit Substanzen arbeitet, die die Luft nicht vertragen und deshalb in einem indifferenten Gasstrom filtriert werden müssen.

0,5507 g Sbst.: 0,8406 g AgCl. — 0,1961 g Sbst.: 12,8 ccm N (18°, 754 mm).

$C_6H_{13}ONCl_2$. Ber. N 7,55, Cl 38,10.

Gef. „ 7,48, „ 37,74.

Das Salz ist gegen Wärme relativ beständig, erst bei ziemlich hoher Temperatur zersetzt es sich. Es löst sich in kaltem Wasser sofort und alles Chlor ist dann durch Silberlösung fällbar. Offenbar findet die Verwandlung in Leucin und Salzsäure sogleich statt. Ebenso leicht löst sich das Salz in kaltem Alkohol unter ziemlich starker Wärmeentwickelung. Dabei entsteht eine große Menge von Leucinester, der sich nach dem Verdünnen mit Wasser durch Alkali abscheiden läßt.

Komplizierter ist die Wirkung des Ammoniaks. Trägt man das Salz in eine kalte, ätherische Lösung von Ammoniak ein, so findet sofort Reaktion statt, die durch Schütteln und neues Einleiten von gasförmigem Ammoniak ziemlich rasch zu Ende geführt wird. Über die Natur der verschiedenen hierbei entstehenden Körper, die zum Teil in Wasser sehr schwer löslich sind, gestatten die bisherigen Beobachtungen kein Urteil.

Besonders wichtig ist die Verwendbarkeit des Leucylchlorids für den Aufbau der Polypeptide. Sie wurde bisher allerdings nur an einem Beispiel, und zwar durch Kombination mit Glykocollester, geprüft. Das erste Produkt dieser Reaktion ist höchstwahrscheinlich Leucylglycinester. Da er aber schlecht kristallisiert und leicht in Leucylglycinanhydrid übergeht, so habe ich mich damit begnügt, dieses zu isolieren.

5,6 g salzsaures Leucylchlorid, die aus 5 g Leucin frisch bereitet waren, wurden allmählich unter Schütteln in eine kalte, verdünnte (etwa 4-prozentige), ätherische Lösung von überschüssigem Glykocollester eingetragen, dann $^1/_2$ Stunde auf der Maschine geschüttelt, schließlich die farblose, kristallinische Masse abgesaugt und mit Äther gewaschen. Ausbeute 9 g. Das Produkt enthält, neben salzsaurem Glykocollester, wahrscheinlich das Hydrochlorat des Leucylglycinesters. In der doppelten Menge kaltem Wasser löst es sich zum größten Teil und auf Zusatz von überschüssigem Ammoniak fällt nichts aus. Wird aber die ammoniakalische Lösung auf dem Wasserbade eingeengt, so beginnt bald die Kristallisation von Leucylglycinanhydrid,

$$C_4H_9.HC\langle{}^{CO.NH}_{NH.CO}\rangle CH_2\,,$$

das aus dem Ester des Dipeptides durch Abspaltung von Alkohol entsteht. Die erste Kristallisation an fast reinem Anhydrid betrug 1,7 g; die rote Mutterlauge gab beim Einengen noch 2,1 g derselben Verbindung, aber weniger rein. Die Gesamtausbeute (3,8 g) betrug mithin, berechnet auf die angewandten 5 g Leucin, fast 60% der Theorie. Zur Reinigung wurde das Produkt aus heißem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Salzsäure umkristallisiert, wobei es sich in feinen, farblosen Nadeln vom Schmp. 239° (korr. 244°) abschied, die für die Analyse bei 100° getrocknet waren.

0,1647 g Sbst.: 0,3422 g CO_2, 0,1224 g H_2O.

$C_8H_{14}O_2N_2$. Ber. C 56,47, H 8,24.

Gef. „ 56,60, „ 8,31.

Die Verbindung ist von Herrn Brunner im hiesigen Institut schon vorher aus dem Leucylglycin durch Erhitzen gewonnen, aber bisher

nicht beschrieben worden. Ich habe mich ferner überzeugt, daß sie aus dem salzsauren Leucylglycinester, der aus dem Dipeptid durch Alkohol und Salzsäure entsteht, bei der oben angegebenen Behandlung in großer Menge gebildet wird.

Mit diesem Resultat ist der Beweis geliefert, daß die Aminosäuren mit dem Umweg über ihre Chloride zum Aufbau von Polypeptiden benutzt werden können. Versuche, diese wichtige Reaktion auf die anderen biologisch wichtigen Aminosäuren auszudehnen, sind bereits im Gange.

Salzsaures Alanylchlorid, $CH_3.CH(NH_3Cl).COCl$.

Die Darstellung war genau dieselbe wie beim Leucinderivat, nur mit anderen Mengenverhältnissen. Auf 1 Teil Alanin wurden 2,5 g Phosphorpentachlorid (berechnet 2,3 g) angewendet. Das Produkt ist auch hier eine farblose, aus äußerst kleinen Kriställchen bestehende, lockere Masse.

0,1933 g Sbst.: 0,1795 g CO_2, 0,0866 g H_2O. — 0,5234 g Sbst.: 1,0340 g AgCl ·

$C_3H_7ONCl_2$. Ber. C 25,00, H 4,90, Cl 49,24.
Gef. „ 25,32, „ 5,01, „ 48,85.

Im Kapillarrohr rasch erhitzt, beginnt das Salz oberhalb 110° zu sintern, zeigt aber keinen deutlichen Schmelzpunkt. Im übrigen gleicht es durchaus dem Leucinderivat.

Ähnlich dem racemischen Alanin verhält sich das optisch-aktive, natürliche *d*-Alanin, aber die Analysen des Produktes haben noch keine genau stimmenden Zahlen gegeben.

Salzsaures α-Amino-butyrylchlorid, $CH_3.CH_2.CH(NH_3Cl).COCl$.

Angewendet wurden 1 g α-Aminobuttersäure, 2,2 g Phosphorpentachlorid und 20 ccm Acetylchlorid. Beim Umschütteln schied sich bald ein hübsch kristallisiertes Produkt aus. Zur Beendung der Reaktion wurde 3 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Ausbeute 1 g.

0,4844 g Sbst.: 0,8716 g AgCl.

$C_4H_9ONCl_2$. Ber. Cl 44,9.
Gef. „ 44,5.

Versuche, die gleiche Reaktion auf die anderen biologisch wichtigen Amino-, Diamino- und Oxyaminosäuren zu übertragen, sind bereits im Gange. Heftiger als die freien Säuren reagieren ihre Ester mit Phosphorpentachlorid. Die dabei entstehenden Chlorverbindungen sind aber noch nicht genügend untersucht. Ich will deshalb speziell

nur erwähnen, daß nach Versuchen des Herrn Umetaro Suzuki der Cystindimethylester, dessen Hydrochlorat $[—S.CH_2.CH(NH_3Cl).CO_2CH_3]_2$ auf die gewöhnliche Art erhalten wird und in langen, farblosen, gegen 162° unter Zersetzung schmelzenden Prismen kristallisiert, in ätherischer Lösung mit PCl_5 ein solches Derivat als weißes Pulver liefert.

Wie zu erwarten war, sind die salzsauren Aminosäurechloride sehr reaktionsfähige Stoffe. Ich habe mich überzeugt, daß sie mit einer ganzen Anzahl anderer Körper leicht in Wechselwirkung treten, und ich zweifle nicht daran, daß man mit ihrer Hilfe das Radikal der Aminosäuren in sehr verschiedene Verbindungen einführen kann. Ich beabsichtige, diese Synthesen in ausgedehntem Maße zu bearbeiten.

Schließlich sage ich Herrn Dr. Ferd. Reuter herzlichen Dank für die wertvolle Hilfe, die er bei obigen Versuchen geleistet hat.

---

34. Emil Fischer und Umetaro Suzuki: Synthese von Polypeptiden. X.[1]) Polypeptide der Diamino- und Oxyaminosäuren.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 38, 4173 (1905).
(Eingegangen am 11. Dezember.)

Um die künstlichen Polypeptide für die Aufklärung der natürlichen Peptone und Proteïne zu verwerten, ist es notwendig, auch die Derivate der in den Eiweißstoffen regelmäßig enthaltenen Diamino- und Oxyaminosäuren kennen zu lernen. Wir haben deshalb die synthetischen Methoden, die sich bei den Monoaminosäuren so fruchtbar erwiesen, auf diese Körperklasse übertragen, und es ist uns mit Hilfe der Ester in der Tat gelungen, verschiedene Dipeptide und Diketopiperazine zu erhalten.

Wird z. B. der Methylester der Diamino-propionsäure kurze Zeit auf 100° erhitzt, so treten 2 Moleküle unter Abspaltung von 1 Molekül Methylalkohol zusammen nach der Gleichung:

$$2\,C_4H_{10}N_2O_2 = C_7H_{16}N_4O_3 + CH_4O\,.$$

Das Produkt ist der Methylester des Dipeptids und läßt sich in dieses durch Verseifung mit Alkali überführen. Was die Struktur des letzteren betrifft, so bleibt vorläufig die Wahl zwischen den beiden Formeln:

$$NH_2.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CH(NH_2).COOH$$

$$\begin{array}{l} NH_2.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH.COOH \\ CH_2.NH_2\,. \end{array}$$

Da jedes von diesen Molekülen 2 asymmetrische Kohlenstoffatome enthält, so sind auch noch je 2 stereoisomere Racemformen,

---

[1]) In der Reihe der Mitteilungen über die Synthese von Polypeptiden ist die vorliegende als zehnte bezeichnet, weil ein Teil der Resultate bereits am 8. Dezember 1904 der Akademie der Wissenschaften zu Berlin vorgelegt wurde (vgl. Sitzungsberichte d. Akad. **1904**, 1333 und Chem. Zentralbl. **1905**, I, 354) und ihre Veröffentlichung in den Berichten d. d. chem. Gesellsch. schon im April d. J. beabsichtigt war. Die Verzögerung ist durch die große Vermehrung des experimentellen Materials verursacht worden.

im ganzen also vier verschiedene Körper bei der Synthese zu erwarten.

Wir halten es deshalb für sehr wohl möglich, daß die von uns erhaltenen Präparate Gemische von Isomeren sind.

Etwas anders verläuft die Kondensation des Lysin-methylesters bei 100°, denn als Hauptprodukt entsteht hier nach der Gleichung

$$2\ C_7H_{16}N_2O_2 = C_{12}H_{24}N_4O_2 + 2\ CH_4O$$

eine starke Base, die wir in Form des gut kristallisierenden Pikrats und Hydrochlorats analysiert haben, und die wir für ein Piperazinderivat von der Formel:

$$\begin{array}{l} NH_2.CH_2.CH_2.CH_2.CH_2.CH.NH.CO \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \dot{C}O.NH.\dot{C}H.CH_2.CH_2.CH_2.CH_2.NH_2 \end{array}$$

halten.

Als Zwischenprodukt dürfte aber bei dem Vorgang auch der Methylester des Dipeptids entstehen. Darauf deuten wenigstens die Resultate, die wir erhielten, als der Lysinmethylester nur 2 Stunden auf 50° erhitzt wurde; denn es entsteht dann ein Sirup, aus dem man die Salze des Piperazinderivates nicht gut isolieren kann, der aber nach der Verseifung mit Alkali reichliche Mengen des Dipeptids des Lysins liefert.

Da das angewandte Lysin racemisch war, so konnten bei der Synthese des Anhydrids und des Dipeptids ebenfalls zwei racemische Stereoisomere entstehen.

Histidin-methylester gibt beim Erhitzen auf 100° auch ein schön kristallisierendes Produkt von der Formel $C_{12}H_{14}N_6O_2$, das wir wiederum für ein Diketopiperazin halten, und das durch verdünntes Alkali zu dem entsprechenden Dipeptid aufgespalten wird.

Bei dem Methylester des Serins findet der gleiche Vorgang schon bei gewöhnlicher Temperatur statt, und da das benutzte Serin racemisch war, so haben wir ganz übereinstimmend mit der Theorie zwei isomere Produkte von der Formel $C_6H_{10}N_2O_4$ isolieren können, die wir als Stereoisomere von der Struktur:

$$CH_2(OH).CH\left\langle\begin{array}{c}CO.NH\\NH.CO\end{array}\right\rangle CH.CH_2.OH$$

betrachten. Sie werden ebenfalls von kaltem Alkali leicht gelöst, und es ist dadurch gelungen, auch ein Dipeptid des Serins zu gewinnen.

Bei dem Isoserin, welches die Aminogruppe in der β-Stellung enthält, ist die Bildung des Diketopiperazins nicht möglich. In Übereinstimmung damit verwandelt sich der Isoserinmethylester bei ge-

wöhnlicher Temperatur in ein festes Produkt, das wir als Methylester des Dipeptids von der Formel:

$$NH_2.CH_2.CH(OH).CO.NH.CH_2.CH(OH).COOCH_3$$

ansehen, denn es läßt sich durch Verseifen mit Alkali leicht in das Dipeptid umwandeln.

Die Nomenklatur der neuen Produkte wollen wir, soweit es möglich ist, derjenigen der einfachen Polypeptide anpassen. Wir nennen deshalb die Dipeptide: Lysyl-lysin, Histidyl-histidin, Seryl-serin, Isoseryl-isoserin, und die dazu gehörigen Diketopiperazine: Lysin-anhydrid, Histidin-anhydrid und Serin-anhydrid. Eine Ausnahme ist nur bei der Diaminopropionsäure unvermeidlich, weil hier zu monströse Namen resultieren würden; wir bezeichnen deshalb ihr Derivat als Diaminopropionsäuredipeptid.

Besonders komplizierten Verhältnissen sind wir beim Arginin begegnet. Sein Methylester verwandelt sich auch schon bei gewöhnlicher Temperatur im Laufe von wenigen Stunden in einen dicken Sirup, aus dem wir in reichlicher Menge ein verhältnismäßig schön kristallisierendes Pikrat bzw. Nitrat isolieren konnten. Aber dieser Körper scheint kein einfaches Dipeptid zu sein, denn die Analyse des Nitrats hat ziemlich stark abweichende Werte gegeben, und es ist uns auch nicht gelungen, die Base durch Kochen mit Säuren in Arginin zurückzuverwandeln. Wir müssen deshalb die Frage nach der Zusammensetzung dieser Base vorläufig unentschieden lassen, werden aber bei dem großen Interesse, das gerade die peptidartigen Derivate des Arginins darbieten, die Versuche wiederholen und vervollständigen.

Die Ester der Diaminosäuren, die als Ausgangsmaterial dienten, waren bisher im freien Zustand nicht bekannt. Dagegen sind die Hydrochlorate von Diaminopropionsäureäthylester und Histidinmethylester einerseits von Curtius und Müller[1]) und andererseits von Pauly[2]) vor kurzer Zeit beschrieben worden.

Diaminopropionsäure-methylester.

Die Verbindung ist als Hydrochlorat viel leichter darzustellen, als das von Curtius beschriebene Salz des Äthylesters.

Suspendiert man 5 g salzsaure Diaminopropionsäure oder die entsprechende Menge Bromwasserstoffsalz in 250 ccm trocknem Methylalkohol und leitet ohne Kühlung trocknes Salzsäuregas bis zur Sättigung ein, so findet klare Lösung statt. Wird dann unter stark vermindertem

---

1) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1278 [1904].

2) Zeitschr. für physiolog. Chem. **42**, 514.

Druck eingeengt, so scheidet sich das Hydrochlorat des Methylesters kristallinisch ab. Um die Kristallisation zu vervollständigen, fügt man ziemlich viel Äthylalkohol zu und läßt einige Stunden bei 0⁰ stehen. Die Kristalle werden abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen. Aus der Mutterlauge läßt sich durch Verdampfung im Vakuum noch eine kleine Menge desselben Salzes gewinnen. Die Gesamtausbeute betrug 76% der Theorie. Für die Analyse wurde bei 80⁰ im Vakuum getrocknet.

0,1953 g Sbst.: 0,2901 g AgCl.

$C_4H_{10}N_2O_2 . 2\,HCl$. Ber. Cl 37,11. Gef. Cl 36,72.

Im Kapillarrohr rasch erhitzt, schmilzt das Salz nicht ganz scharf gegen 166⁰ (korr.) unter starkem Schäumen und Braunfärbung. Es löst sich in Wasser sehr leicht, in Methylalkohol schon viel schwerer und in Äthylalkohol sehr schwer; in Äther, Chloroform, Benzol ist es so gut wie unlöslich.

Die Verwandlung des Salzes in den freien Ester hat einige Schwierigkeiten gemacht. Die Zersetzung mit Silberoxyd ist nicht ratsam, weil das Chlorsilber durch den stark basischen Ester in Lösung gehalten wird, und die Methode, die bei den Estern der Monoaminosäuren so gute Resultate liefert, d. h. Zerlegen des Salzes in konzentrierter wässeriger Lösung mit Alkali unter Zusatz von Kaliumcarbonat und Ausschütteln mit Äther, gibt hier eine sehr schlechte Ausbeute. Wir haben deshalb die Zerlegung des Hydrochlorats in methylalkoholischer Lösung mit der berechneten Menge Natriummethylat ausgeführt und dadurch ein sehr befriedigendes Resultat erzielt.

10 g fein gepulverter, salzsaurer Methylester werden mit einer Lösung von 2,41 g Natrium in 120 ccm trocknem Methylalkohol 5 bis 10 Minuten geschüttelt, bis Umsetzung erfolgt ist; dann versetzt man mit der dreifachen Menge absolutem Äther, läßt einige Stunden stehen, bis durch Abscheidung des Chlornatriums die Flüssigkeit geklärt ist, filtriert und verdampft unter stark vermindertem Druck bei einer Temperatur, die nicht über 35⁰ hinaufgeht. Der zurückbleibende Ester bildet einen fast farblosen, stark alkalisch reagierenden Sirup, der in Wasser und Alkohol sehr leicht, in Äther aber sehr schwer löslich ist und durch Salzsäure in das ursprüngliche Produkt zurückverwandelt wird.

Diaminopropionsäure-dipeptid-methylester.

Die Verwandlung des zuvor beschriebenen freien Methylesters in das Dipeptid erfolgt schon bei Zimmertemperatur im Laufe von einigen Tagen. Dasselbe erreicht man bei 100⁰ in einer Stunde, nur muß beim

Erhitzen der Zutritt von Wasser vermieden werden. Die Operation wird deshalb am besten im geschlossenen Rohr ausgeführt. Der ursprünglich fast farblose Ester färbt sich schwach braun und verwandelt sich in einen dicken Sirup, der in Wasser äußerst leicht, aber in absolutem Alkohol sehr schwer löslich ist. Beim Verreiben des Rohproduktes mit Äthylalkohol geht der Sirup in eine fast weiße, feste, aber amorphe Masse über, die sich filtrieren und mit Alkohol und Äther waschen läßt, aber an feuchter Luft zerfließt und stark alkalisch reagiert. Für die Reinigung haben wir das Pikrat oder Hydrochlorat benutzt.

Um das erste Salz darzustellen, löst man das Dipeptid in möglichst wenig kaltem Wasser und setzt alkoholische Lösung von Pikrinsäure so lange zu, als noch ein Niederschlag entsteht. Auf die Menge des Dipeptidesters, die aus 10 g salzsaurem Diaminopropionsäuremethylester erhalten wird, braucht man ungefähr 9 g Pikrinsäure. Ein Überschuß derselben schadet aber nichts, da er leicht entfernt werden kann. Das ausfallende Pikrat ist zuerst ein amorpher, gelber Niederschlag, verwandelt sich aber im Laufe einiger Stunden in eine harte, kristallinische Masse, die abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen wird. Die Ausbeute an Pikrat betrug aus obigen 10 g Ausgangsmaterial 11,65 g oder 67% der Theorie. Zur Reinigung wird das Salz zuerst mit Äther fein zerrieben und dann mit absolutem Alkohol, worin es fast unlöslich ist, ausgekocht. Zum Umkristallisieren dient dann 50-prozentiger Alkohol. Es hat sich dabei als zweckmäßig erwiesen, zuerst mit einer verhältnismäßig kleinen Menge des Lösungsmittels (auf 1 Teil Pikrat etwa 15 Teile) auszukochen, wobei der größte Teil der Verunreinigungen in Lösung geht, und dann den reineren Rückstand vollends in dem kochenden, 50-prozentigen Alkohol aufzulösen, wovon ungefähr noch 70 Teile nötig sind. Aus der erkalteten Flüssigkeit scheidet sich das Pikrat langsam als gelbe, leichte, kristallinische Masse ab. Zur Analyse wurde nochmals in derselben Weise umkristallisiert und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

0,1271 g Sbst.: 0,1600 g CO_2, 0,0417 g H_2O. — 0,1074 g Sbst.: 19,2 ccm N (18°, 776 mm).

$(C_7H_{16}N_4O_3)(C_6H_3N_3O_7)_2$. Ber. C 34,44, H 3,33, N 21,15.
Gef. „ 34,33, „ 3,64, „ 21,12.

Das Salz hat keinen konstanten Schmelzpunkt. Beim Erhitzen im Kapillarrohr sinkt es schon von 100° an etwas zusammen, färbt sich zwischen 170—180° dunkler und schmilzt zwischen 200° und 210° unter Aufschäumen. Es ist in kaltem Wasser ziemlich schwer, in warmem leicht löslich. Von heißem Alkohol wird es nur sehr wenig und von Äther, Benzol, Chloroform so gut wie gar nicht gelöst.

Um das Pikrat in Hydrochlorat zu verwandeln, suspendierten wir 2,65 g in 10 ccm kaltem Wasser und 8 ccm Normal-Salzsäure und verrieben dann sorgfältig in einem Mörser. Die ausgeschiedene Pikrinsäure wurde mehrmals ausgeäthert, dann die entfärbte Flüssigkeit möglichst rasch bei niederer Temperatur eingeengt, um Verseifung zu vermeiden, und schließlich mit absolutem Alkohol gefällt. Das Hydrochlorat wird so als weißes, amorphes Pulver erhalten, das sich mit Alkohol und Äther waschen läßt. Die Ausbeute betrug 1,04 g oder 93% der Theorie. Zur Reinigung wurde es nochmals in wenig Wasser gelöst, mit Tierkohle geschüttelt und aus dem Filtrat durch Methylalkohol und Äther gefällt. Für die Analyse wurde es im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1688 g Sbst.: 0,1847 g CO_2, 0,0979 g H_2O. — 0,1332 g Sbst.: 23,1 ccm N (17°, 770 mm). — 0,0844 g Sbst.: 0,0881 g AgCl.

$C_7H_{16}N_4O_3 . 2\,HCl$.	Ber. C 30,32,	H 6,50,	N 20,22,	Cl 25,63.
	Gef. „ 29,85,	„ 6,44,	„ 20,39,	„ 25,8.

Das Hydrochlorat ist ein fast weißes, ziemlich schweres Pulver, das aber keine deutliche Kristallform zeigt und keinen Schmelzpunkt hat. Im Kapillarrohr fängt es schon gegen 90° an zu sintern und schwillt gegen 135° stark auf. Es ist in Wasser sehr leicht, in Methylalkohol und Äthylalkohol aber sehr schwer und in Äther, Benzol fast gar nicht löslich. Die wässerige Lösung reagiert auf Lakmus sauer und gibt mit Phosphorwolframsäure einen dicken, amorphen Niederschlag, der sich bei gelindem Erwärmen in ein schweres, körniges Pulver verwandelt. Chloroplatinat und Aurochlorat sind in Wasser leicht löslich. Das erste wird durch Alkohol als undeutlich kristallinisches Pulver gefällt. Das zweite scheidet sich schon beim Abkühlen aus der konzentrierten, wässerigen Lösung als dicker, gelber Sirup ab.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, besteht die Möglichkeit, daß unsere Präparate Gemische von Isomeren sind.

Diaminopropionsäure-dipeptid.

Wird das zuvor erwähnte Hydrochlorat des Dipeptid-methylesters mit Wasser eine Stunde auf 80° erhitzt, so findet Verseifung statt. Aber die Reaktion ist nicht vollständig und verläuft auch nicht glatt. Viel bessere Resultate erhält man bei der Verseifung mit Alkali in gewöhnlicher Temperatur. Es ist dann auch nicht nötig, erst die Salze des Dipeptidmethylesters darzustellen, sondern man kann direkt das rohe Kondensationsprodukt verarbeiten. Dementsprechend gestaltet sich die Darstellung des Diaminopropionsäuredipeptids folgendermaßen:

Der aus 5 g Hydrochlorat in der zuvor beschriebenen Weise dargestellte freie Diaminopropionsäure-methylester wird als Sirup zuerst zwei Tage bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt, wobei schon partielle Kondensation stattfindet und dann zum Schluß noch eine Stunde auf 90° erhitzt. Das Produkt ist ein brauner Sirup, der zuerst mit absolutem Alkohol bei etwa 60° digeriert wird, wobei nur ein kleiner Teil in Lösung geht. Der unlösliche Rückstand wird sofort in 15 ccm Wasser gelöst und die Flüssigkeit nach Zusatz von 15 ccm Normal-Natronlauge zwei Stunden bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt. Dann fügt man zur Neutralisation des Alkalis 15 ccm farblose Normal-Jodwasserstoffsäure zu, schüttelt in der Kälte mit etwas Tierkohle und verdampft das Filtrat unter sehr stark vermindertem Druck bei möglichst niedriger Temperatur zum Sirup. Dieser ist durch wenig freies Jod gelblichbraun gefärbt. Er wird zur Entfernung des Jodnatriums mehrmals mit absolutem Alkohol sorgfältig ausgekocht; hierbei bleibt das Dipeptid als zähe, gummiartige Masse zurück, die durch Spuren von Jod gelb bis bräunlichgelb gefärbt sein kann. Es löst sich sehr leicht in Wasser und reagiert stark alkalisch. Von den Salzen haben wir das Pikrat und das Hydrochlorat genauer untersucht.

Pikrat. Das aus 5 g salzsaurem Diaminopropionsäure-methylester gewonnene Dipeptid wird in 30 ccm Wasser gelöst, mit Tierkohle geklärt und zum Filtrat eine Lösung von 5,7 g reiner Pikrinsäure in 30 ccm absolutem Alkohol zugegeben. Der sofort ausfallende, gelbe, kristallinische Niederschlag wird abgesaugt und mit absolutem Alkohol, später mit Äther gewaschen. Die Ausbeute beträgt ungefähr 6 g oder 75% der Theorie, berechnet auf den angewandten Diaminopropionsäure-methylester. Zur Reinigung des Salzes haben wir 5 g dieses Rohproduktes zuerst zweimal mit je 50 ccm 50-prozentigem Alkohol ausgekocht, heiß filtriert, mit demselben Alkohol nachgewaschen, dann den Rückstand in kochendem, 50-prozentigem Alkohol gelöst und die filtrierte Flüssigkeit bei 0° der Kristallisation überlassen. Die ausgeschiedene Masse wurde für die Analyse nochmals aus heißem, 50-prozentigem Alkohol umgelöst und im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,1940 g Sbst.: 0,2347 g CO_2, 0,0566 g H_2O. — 0,108 g Sbst.: 20,4 ccm N (24°, 760 mm).

$(C_6H_{14}N_4O_3)(C_6H_3N_3O_7)_2$. Ber. C 33,33, H 3,09, N 21,60.
Gef. „ 33,00, „ 3,25, „ 21,31.

Das Salz enthält mithin auf ein Dipeptid zwei Mol. Pikrinsäure. Es ist ein zitronengelbes, undeutlich kristallinisches Pulver und hat keinen scharfen Schmelzpunkt. Im Kapillarrohre fängt es bei 200° an zu sintern und sich braun zu färben, und schmilzt beim raschen Erhitzen gegen 222° (korr.) unter Aufschäumen. In kaltem Wasser ist es sehr

schwer löslich; beim Kochen damit löst es sich teilweise, und der andere Teil schmilzt zu einem Öl. In absolutem Alkohol ist es auch sehr schwer löslich; leichter wird es, wie zuvor erwähnt, von heißem, 50-prozentigem Alkohol aufgenommen. In warmem Aceton löst es sich auch verhältnismäßig leicht, dagegen ist es in Äther, Essigester, Benzol und Petroläther fast unlöslich.

Hydrochlorat. Das Salz kann sowohl aus dem gereinigten Pikrat, wie direkt aus dem rohen Dipeptid bereitet werden.

Im ersten Falle löst man eine abgewogene Menge des Pikrats in heißem, 50-prozentigem Alkohol, kühlt auf etwa 60° ab und fügt, bevor Kristallisation eintritt, die berechnete Menge Salzsäure hinzu. Dann kühlt man sofort stärker auf gewöhnliche Temperatur und schüttelt diese Lösung wiederholt mit größeren Mengen Äther aus, bis alle Pikrinsäure dadurch entfernt ist. Das Hydrochlorat des Dipeptids bleibt hierbei in der wässerigen Flüssigkeit. Diese wird zuerst durch Schütteln mit etwas Tierkohle völlig entfärbt und dann unter sehr geringem Druck verdampft. Das Hydrochlorat bleibt als kristallinische Masse zurück, die mit Alkohol und Äther gewaschen wird. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Für die Analyse wurde das Präparat nochmals in sehr wenig Wasser gelöst, durch Alkohol gefällt und im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,1688 g Sbst.: 0,1683 g CO_2, 0,0956 g H_2O. — 0,128 g Sbst.: 0,1378 g AgCl.

$C_6H_{14}N_4O_3 . 2\,HCl$. Ber. C 27,38, H 6,08, Cl 27,00.
Gef. „ 27,19, „ 6,29, „ 26,63.

Das Salz enthält also ebenso wie das Pikrat zwei Moleküle Säure. Es hat keinen konstanten Schmelzpunkt. Im Kapillarrohr zersetzt es sich über 250° unter Bräunung und Schmelzung. Es löst sich sehr leicht in kaltem Wasser und reagiert ziemlich stark sauer. An feuchter Luft aufbewahrt, zerfließt es allmählich. In Alkohol, Äther, Benzol ist es so gut wie unlöslich.

Die wässerige Lösung gibt mit überschüssigem Alkali und Kupfersalzen die Biuretfärbung, und diese ist selbst bei den reinsten Präparaten so stark, daß sie nicht durch eine Beimengung von höherem Peptid verursacht zu sein scheint. Wir heben das hervor, weil die Biuretfärbung bei den einfachen Dipeptiden nicht auftritt.

Wird das Salz mit der 10-fachen Menge 20-prozentiger Salzsäure 5—6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, so scheint völlige Spaltung in Diaminopropionsäure einzutreten. Wir haben letztere als Methylesterhydrochlorat isoliert (ber. Cl 37,11; gef. Cl 36,77) und 70% der Theorie erhalten, während bei Anwendung von reinem Diaminopropionsäurehydrochlorat die Ausbeute 76% betrug.

Wie oben erwähnt, kann das Hydrochlorat auch aus dem rohen Diaminopropionsäure-dipeptid direkt gewonnen werden. Man löst dann das möglichst von Jodnatrium befreite Präparat zuerst in sehr wenig Wasser, fällt mit absolutem Alkohol, löst nach Entfernung der Mutterlauge wieder in wenig Wasser, fügt einen kleinen Überschuß von Salzsäure hinzu und fällt jetzt das Hydrochlorat durch Alkohol. Zur Reinigung des Salzes werden die Lösung in Wasser und die Fällung mit Alkohol wiederholt. Bei diesem abgekürzten Verfahren beträgt die Ausbeute ungefähr die Hälfte des angewandten salzsauren Diaminopropionsäure-methylesters.

Lysin-methylester (inaktiv), $C_6H_{13}N_2O_2.CH_3$.

Für die nachfolgenden Versuche diente synthetisch gewonnenes racemisches Lysin, von dem uns Herr Dr. F. Weigert eine größere Menge gütigst zur Verfügung gestellt hat. Wir werden sie aber mit der aktiven Base wiederholen. Suspendiert man 5 g Lysinchlorid in 200 ccm Methylalkohol und leitet Salzsäuregas bis zur Sättigung ein, so geht das Salz bald in Lösung, und nach kurzer Zeit beginnt schon die Kristallisation des salzsauren Methylesters. Um sie zu vervollständigen, fügt man nach dem Erkalten die gleiche Menge Äther zu und läßt einige Stunden stehen. Die farblose Kristallmasse, die meistens aus schief abgeschnittenen Prismen besteht, wird abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen. Die Ausbeute betrug mehr als 90% der Theorie.

Für die Analyse wurde das Salz nochmals in heißem Methylalkohol gelöst, durch Äther wieder gefällt und im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,1168 g Sbst.: 11,7 ccm N (18°, 769 mm). — 0,1445 g Sbst.: 0,1794 g AgCl.

$C_7H_{16}N_2O_2.2\,HCl$. Ber. N 12,02, Cl 30,47.
Gef. „ 11,76, „ 30,69.

Das Salz ist in Wasser sehr leicht löslich. Die Löslichkeit nimmt dann sukzessive ab für Methylalkohol, Äthylalkohol und Aceton, und in Äther, Benzol ist es so gut wie unlöslich. Es schmilzt nicht scharf unter starkem Aufschäumen beim raschen Erhitzen gegen 218° (korr.), während das entsprechende Lysinhydrochlorat schon bei 167° (korr.) schmilzt.

Lysin-anhydrid (inaktiv).

2 g salzsaurer Lysinmethylester werden in 25 ccm warmem Methylalkohol gelöst und nach dem Erkalten mit 19,7 ccm einer Lösung versetzt, die aus 2 g Natrium und 100 ccm Methylalkohol bereitet ist;

dann wird die ganze Flüssigkeit mit dem dreifachen Volumen reinem Äther vermischt, wobei das Natriumchlorid ausfällt. Wird die nach einigen Stunden filtrierte Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck verdampft, so bleibt der Lysinmethylester als fast farbloser, alkalisch reagierender Sirup zurück. Zur Umwandlung in das Anhydrid erhitzt man ihn im Einschlußrohr zwei Stunden auf 100°, wobei er sich in eine schwach braune, zähflüssige Masse verwandelt. Diese wurde mit Äther gewaschen und diente dann zur Darstellung des Pikrats und Hydrochlorats, die beide kristallisieren. Zur Bereitung des ersten Salzes löst man das rohe Lysinanhydrid in wenig warmem Äthylalkohol und fügt eine alkoholische Lösung von Pikrinsäure zu. Von dieser genügen 2,5 g, wenn man von 2 g salzsaurem Lysinmethylester ausgegangen ist. Das Pikrat des Lysinanhydrids ist in Alkohol löslich. Es wird deshalb durch Äther gefällt und bildet eine schöne, gelbe, kristallinische Masse. Die Ausbeute betrug auf obige Menge Ausgangsmaterial berechnet 2,11 g oder 70% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wurde das Salz aus wenig heißem Wasser umkristallisiert und für die Analyse im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,1597 g Sbst.: 0,2354 g CO_2, 0,0610 g H_2O. — 0,1125 g Sbst.: 18,9 ccm N (18°, 762 mm).

$C_{12}H_{24}N_4O_2 . (C_6H_3N_3O_7)_2$. Ber. C 40,33, H 4,20, N 19,61.
Gef. „ 40,20, „ 4,24, „ 19,46.

Das Salz kristallisiert aus Wasser in gelben, kleinen Prismen oder Platten. Im Kapillarrohr rasch erhitzt, fängt es gegen 210° an, sich dunkel zu färben, und schmilzt unter Zersetzung gegen 230° (korr.). Es löst sich in warmem Wasser leicht, in kaltem erheblich schwerer; in Methyl- und Äthylalkohol ist es besonders in der Wärme ziemlich leicht löslich, dagegen wird es von Äther und Petroläther äußerst schwer aufgenommen.

Um das entsprechende Hydrochlorat darzustellen, löst man das rohe Lysinanhydrid in Methylalkohol und leitet in der Kälte vorsichtig Salzsäuregas ein. Dadurch wird das Hydrochlorat als weiße Masse gefällt, die abgesaugt und mit Äther gewaschen wird. Bei Anwendung von 2 g salzsaurem Methylester betrug die Ausbeute 3,3 g oder 91% der Theorie. Für die Analyse wurde das Salz nochmals in Alkohol gelöst, durch Benzol wieder gefällt und im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,1751 g Sbst.: 0,2790 g CO_2, 0,1245 g H_2O. — 0,1152 g Sbst.: 0,1004 g AgCl.

$(C_{12}H_{24}N_4O_2) . 2\,HCl$. Ber. C 43,77, H 7,90, Cl 21,58.
Gef. „ 43,46, „ 7,90, „ 21,55.

Das gleiche Salz erhält man aus dem Pikrat, indem man dieses in verdünntem Alkohol löst, durch die berechnete Menge Salzsäure

zerlegt, durch Ausäthern die Pikrinsäure entfernt und die wässerige Lösung im Vakuum verdampft. Das Hydrochlorat bildet feine, farblose Nadeln, die im Kapillarrohr rasch erhitzt, bei 225° anfangen, sich schwarz zu färben, dann sintern und bei höherer Temperatur unter Aufschäumen schmelzen. Es ist spielend leicht löslich in Wasser und reagiert auf Lakmus schwach sauer. Es löst sich auch leicht in Methyl- und Äthylalkohol; dagegen ist es fast unlöslich in Äther, Benzol, Chloroform und Petroläther.

Lysyl-lysin (inaktiv), $C_{12}H_{26}O_3N_4$.

Lysinmethylester, der aus 3 g Hydrochlorat in der zuvor angegebenen Weise dargestellt war, wurde 2 Stunden auf 50° erwärmt. Der hierbei entstehende, ganz schwach braune Sirup besteht wahrscheinlich zum größeren Teil aus Lysyl-lysinmethylester, enthält aber vielleicht auch kleine Mengen des Anhydrids. Zur Umwandlung in das Dipeptid wurde er in 30 ccm *n*-Natronlauge gelöst und 15 Stunden bei 12—15° aufbewahrt, um einerseits den Ester zu verseifen und andererseits das etwa vorhandene Anhydrid aufzuspalten. Zur Neutralisation des Alkalis gaben wir dann 30 ccm *n*-Salzsäure zu, versetzten diese Flüssigkeit ohne weiteres mit 4 g gepulverter Pikrinsäure und erwärmten gelinde bis zur klaren Lösung. Beim Abkühlen in Eis schied sich aus der Flüssigkeit ein Pikrat in feinen, gelben Kristallen ab, die abgesaugt und zweimal aus Wasser oder 50-prozentigem Alkohol unter gelindem Erwärmen umgelöst wurden. Die Menge des rohen Pikrats betrug 3,5 g, die sich durch das zweimalige Umkristallisieren auf 2,1 g verminderte. Das feine, gelbe Pulver zeigte unter dem Mikroskop keine charakteristischen Formen; es besteht größtenteils aus kleinen Körnchen. Es besitzt auch keinen scharfen Schmelzpunkt, denn es verwandelt sich gegen 70° allmählich in gelbes Öl. Das hängt mit dem Gehalt an Kristallwasser zusammen, welches bei 80° im Vakuum völlig entweicht.

0,1233 g wasserhaltiges Salz verloren bei 80° im Vakuum 0,0062 g = 5%.

Bei dem Entweichen des Wassers erstarrt das Salz in der Hitze wieder kristallinisch. Ein bei 80° im Vakuum völlig getrocknetes Präparat fing von 170° an zu sintern, schmolz gegen 185° (korr.) zu einem hellbraunroten Öl und zersetzte sich bei wenig höherer Temperatur unter Schäumen.

0,1596 g wasserhaltige Sbst.: 0,2037 g CO_2, 0,0633 g H_2O. — 0,1901 g Sbst.: 29,7 ccm N (13°, 749 mm). — 0,1233 g Sbst. verloren bei 80° im Vakuum 0,0062 g = 5,0% H_2O.

$C_{12}H_{26}N_4O_3 . 3\, C_6H_3N_3O_7 + 3\, H_2O$.	Ber C 35,46,	H 4,04,	N 17,93,	H_2O 5,3.
	Gef. „ 34,81,	„ 4,41,	„ 18,21,	„ 5,0.

Analyse des bei 80° im Vakuum getrockneten Salzes.

0,2002 g Sbst.: 0,2723 g CO_2, 0,0631 g H_2O. — 0,1502 g Sbst.: 24,3 ccm N (20°, 767 mm).

$C_{12}H_{26}N_4O_3 . 3\, C_6H_3N_3O_7$. Ber. C 37,46, H 3,64, N 18,94.
Gef. „ 37,10, „ 3,50, „ 18,75.

Um die Formel des Salzes zu kontrollieren, wurde noch eine Bestimmung der Pikrinsäure ausgeführt. Zu dem Zweck wurde das Salz in warmem Wasser gelöst und mit einem Überschuß von Salzsäure, etwa 6 Mol., versetzt und die Flüssigkeit auf 0° abgekühlt. Die Pikrinsäure wurde abfiltriert und der in Lösung gebliebene Teil durch wiederholtes Ausäthern gewonnen.

0,1171 g Sbst. (wasserfrei): 0,0850 g Pikrinsäure = 72,6%. Berechnet 71,5%.

Das Pikrat ist in warmem Wasser und kaltem Methylalkohol leicht löslich. Durch Äthylalkohol wird es in der Wärme auch leicht, in der Kälte aber erheblich schwerer aufgenommen. In Benzol, Äther und Petroläther ist es fast unlöslich.

Da die Pikrate solcher komplizierten Basen keine erheblichen Unterschiede in der Zusammensetzung zeigen und deshalb die Analysen keine entscheidende Bedeutung haben können, so wurde wiederum das Hydrochlorat dargestellt.

Zu dem Zweck wurden 2 g Pikrat in 15 ccm Wasser und 5 ccm Alkohol in gelinder Wärme gelöst, dann rasch abgekühlt, mit 6 ccm *n*-Salzsäure versetzt und nun die Pikrinsäure durch wiederholtes Ausäthern entfernt. Die sehr wenig gefärbte, wässerige Lösung wurde noch mit etwas Tierkohle völlig entfärbt und die Flüssigkeit im Vakuumexsikkator verdunstet. Der Rückstand war ein zäher Sirup und enthielt sicherlich keine große Mengen von salzsaurem Lysin. Da er auch bei längerem Stehen nicht kristallisierte, so wurde er mit etwa der 10-fachen Menge Methylalkohol übergossen und durch Einleiten von trockner Salzsäure verestert. Beim Einengen der Lösung unter sehr geringem Druck schieden sich dann hübsche Kristalle ab, welche abfiltriert und mit Äthylalkohol gewaschen wurden. Die Ausbeute betrug 0,6 g.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt in wenig warmem Methylalkohol gelöst und durch Verdunsten der Lösung wieder kristallisiert, dann mit Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen.

Die Kristalle unterschieden sich von dem salzsauren Lysinmethylester durch die äußere Form. Sie sind zuweilen unregelmäßige Täfelchen, häufiger aber kurze, zwillingsartig verwachsene Prismen und schmelzen etwas niedriger, beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr

gegen 205° (korr.) unter starkem Schäumen. Sie lösen sich sehr leicht in Wasser und in warmem Methylalkohol; schwerer in kaltem Methylalkohol, noch schwerer in Äthylalkohol und fast gar nicht in Äther. Die wässerige Lösung reagiert schwach sauer. Für die Analyse wurde das Salz bei 80° im Vakuum getrocknet.

0,1617 g Sbst.: 0,2307 g CO_2, 0,1154 g H_2O. — 0,1110 g Sbst.: 13,2 ccm N (19°, 764 mm). — 0,1120 g Sbst.: 8,65 ccm $^1/_{10}$ *n*-$AgNO_3$ = 0,03075 g Cl. — 0,108 g Sbst.: 8,20 ccm $^1/_{10}$ *n*-$AgNO_3$ = 0,02911 g Cl.

$C_{13}H_{28}N_4O_3 . 3\,HCl$. Ber. C 39,24, H 7,79, N 14,09, Cl 26,89.
Gef. „ 38,90, „ 7,93, „ 13,79, „ 27,41, 26,95.

Histidin-anhydrid, $C_{12}H_{14}O_2N_6$.

Der als Ausgangsmaterial dienende salzsaure Histidinmethylester ist von H. Pauly schon beschrieben[1]). Man löst 3 g Salz in heißem Methylalkohol (etwa 20 ccm), fügt nach dem Erkalten 9,5 ccm einer Lösung zu, die aus 2 g Natrium und 100 ccm Methylalkohol bereitet ist, und vermischt mit dem dreifachen Volumen Äther. Nach einigen Stunden wird filtriert, im Vakuum verdampft, und der als Sirup zurückbleibende Histidinmethylester im Einschlußrohr auf 100° erhitzt. Schon nach einer Stunde fängt die Masse an, in der Hitze Kristalle des Anhydrides abzuscheiden. Dieses läßt sich mit Alkohol und Äther waschen und aus heißem Wasser umkristallisieren. Für die Analyse wurde im Vakuum bei 80° getrocknet.

0,1817 g Sbst.: 0,3490 g CO_2, 0,0862 g H_2O. — 0,1072 g Sbst.: 27,8 ccm N (16°, 762 mm).

$C_{12}H_{14}N_6O_2$. Ber. C 52,55, H 5,11, N 30,66.
Gef. „ 52,39, „ 5,27, „ 30,32.

Die Verbindung löst sich leicht in heißem Wasser und kristallisiert beim Abkühlen in feinen, weißen, glänzenden Nadeln oder Prismen. Sie hat keinen Schmelzpunkt. Im Kapillarrohr fängt sie gegen 260° (korr.) an sich dunkel zu färben, und schmilzt gegen 340° zu einer dunkelbraunen Flüssigkeit. In Alkohol ist sie schwer löslich und in Äther, Benzol, Petroläther fast unlöslich. Ihre wässerige Lösung gibt mit Phosphorwolframsäure einen starken Niederschlag, der auch beim Kochen schwer löslich ist. Hat man aber vorher mit Schwefelsäure angesäuert, so geht das Phosphorwolframat in der Hitze völlig in Lösung und kommt beim Erkalten kristallinisch heraus. Die wässerige Lösung des Histidinanhydrids reagiert alkalisch und löst Kupferoxyd beim Kochen mit schön blauer Farbe.

---

[1]) a. a. O.

Die Base bildet mit Pikrinsäure und Salzsäure kristallisierte Salze.

Pikrat, $C_{12}H_{14}N_6O_2(C_6H_3N_3O_7)_2$. Man löst 1 g Histidinanhydrid in 40 ccm warmem Wasser, fügt 2,5 g fein gepulverte Pikrinsäure hinzu und erwärmt auf 50—60°. Ohne daß klare Lösung erfolgt, findet die Bildung des Pikrats beim starken Umrühren fast vollständig statt. Nach dem Abkühlen auf 0° wird das Salz filtriert und erst mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Die Ausbeute beträgt 2,2 g oder 82% der Theorie. Zur Reinigung wird das Präparat zuerst mit sehr wenig Aceton ausgekocht, filtriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und zum Schluß in heißem Wasser gelöst. Beim langsamen Abkühlen scheidet es sich in zitronengelben, flachen, spießartigen Kristallen ab, die vielfach sternförmig vereinigt sind. Für die Analyse wurde bei 100° getrocknet:

0,1915 g Sbst.: 0,2758 g CO_2, 0,0481 g H_2O. — 0,1190 g Sbst.: 23,4 ccm N (18°, 757 mm).

$C_{12}H_{14}N_6O_2(C_6H_3N_3O_7)_2$.	Ber. C 39,34,	H 2,73,	N 22,95.
	Gef. „ 39,28,	„ 2,79,	„ 22,67.

Im Kapillarrohr erhitzt, beginnt das Salz gegen 235° (korr.) braun zu werden und zersetzt sich gegen 255° (korr.) unter Aufschäumen und Schwärzung. Es ist in kaltem Wasser recht schwer, in heißem erheblich leichter löslich. Die Löslichkeit nimmt dann sukzessive ab für Methyl- und Äthylalkohol; in Essigester, Äther und Benzol ist es sehr schwer löslich. Verhältnismäßig leicht wird es von warmem Aceton aufgenommen.

In geringem Überschuß von verdünnter Salzsäure löst sich das Histidinanhydrid sehr leicht. Läßt man diese Flüssigkeit bei gewöhnlicher Temperatur verdunsten, so scheidet sich das Hydrochlorat in mikroskopisch kleinen, dünnen, farblosen, prismenähnlichen Kristallen ab, die meist sternförmig verwachsen sind und unscharf gegen 320°, (korr.) unter Zersetzung schmelzen.

Histidyl-histidin, $C_{12}H_{16}O_3N_6$.

Schüttelt man 1 g Histidinanhydrid mit 50 ccm *n*-Natronlauge 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur (15—20°), so erfolgt klare Lösung. Nachdem diese noch 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur gestanden hat, neutralisiert man durch Zusatz von 50 ccm *n*-Salzsäure. Zur Isolierung des Dipeptids benutzen wir das Pikrat.

Man fügt direkt zu der wässerigen Lösung 2,5 g gepulverte Pikrinsäure und erwärmt unter Umrühren auf 50—60°, wobei der größte Teil gelöst und der Rest in ein gelbes Öl verwandelt wird. Bei zweitägigem

Stehen in der Kälte scheidet sich eine erhebliche Menge des Pikrats wieder ab, aber nur teilweise kristallinisch. Man entfernt deshalb das Wasser, löst den Rückstand in warmem Alkohol und fällt diese Lösung mit Benzol. Die Ausbeute beträgt ungefähr 2,2 g. Dieses Produkt wird in Wasser von etwa 60° gelöst. In der Kälte scheidet sich dann das Pikrat in sehr kleinen, zitronengelben Prismen, die meist sternförmig verwachsen sind, aus. Die Kristalle scheinen Wasser zu enthalten, denn sowohl beim Waschen mit absolutem Alkohol, wie beim Erhitzen im Vakuum auf 80° verändern sie ihre Farbe in orangegelb. Für die Analyse diente das bei 80° im Vakuum getrocknete Präparat.

0,1101 g Sbst.: 0,1543 g CO_2, 0,0321 g H_2O. — 0,144 g Sbst.: 27,8 ccm N (18°, 750 mm).

$C_{12}H_{16}N_6O_3(C_6H_3N_3O_7)_2$. Ber. C 38,40, H 2,93, N 22,40.
Gef. „ 38,22, „ 3,24, „ 22,05.

Das Salz löst sich in warmem Wasser und kochendem Aceton verhältnismäßig leicht; in Alkohol ist es schwer löslich und in Äther und Benzol gänzlich unlöslich. Das Salz hat keinen scharfen Schmelzpunkt; es schmilzt zwischen 165—175° (unkorr.) und zersetzt sich bei höherer Temperatur vollständig.

Da bei der Aufspaltung der optisch-aktiven Diketopiperazine, die sich von den gewöhnlichen Aminosäuren ableiten, eine partielle Racemisierung stattfindet, so ist das gleiche im vorliegenden Falle wahrscheinlich. Vielleicht erklärt sich damit die geringe Neigung des Dipeptidpikrats zur Kristallisation; Mangel an Material hat uns aber verhindert, diese Vermutung weiter zu prüfen. Leider ist es uns auch nicht gelungen, aus dem Pikrat ein kristallisiertes Hydrochlorat, oder ein schönes Hydrochlorat des entsprechenden Esters darzustellen.

Arginin-methylester-Hydrochlorat.

Als Ausgangsmaterial benutzten wir zuerst das schön kristallisierte Doppelsalz von Arginin und Kupfernitrat, von dem uns Herr Prof. E. Schulze in Zürich 30 g freundlichst zur Verfügung gestellt hat. Das Salz wurde in wässeriger Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat zur Trockne verdampft. 10 g des so erhaltenen Argininnitrats wurden in 500 ccm Methylalkohol suspendiert und trocknes Salzsäuregas ohne Abkühlung bis zur Sättigung eingeleitet. Das Salz geht dabei leicht in Lösung. Die Flüssigkeit wird nun unter vermindertem Druck verdampft, der zurückbleibende Sirup in wenig Äthylalkohol warm gelöst und nach dem Abkühlen viel Äther zugesetzt. Zuerst fällt das Hydrochlorat des Argininmethylesters häufig als

Sirup aus. Dieser verwandelt sich aber beim Stehen in lange, farblose Nadeln oder Prismen. Die Ausbeute betrug 9,96 g oder 94% der Theorie.

Später haben wir größere Mengen, etwa 200 g dieses Salzes aus Edestin nach einem abgekürzten Verfahren bereitet, dessen Mitteilung uns nicht überflüssig erscheint.

1 kg Edestin wird mit 3 L rauchender Salzsäure übergossen, 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann mit der 3-fachen Menge Wasser verdünnt und bei gewöhnlicher Temperatur mit einer 50-prozentigen Lösung von Phosphorwolframsäure (etwa 4 kg) gefällt, so lange noch ein erheblicher Niederschlag entsteht. Dieser wird scharf abgesaugt, darauf stark gepreßt, dann mit viel 5-prozentiger Schwefelsäure sorgfältig verrieben, abgesaugt und gepreßt und die gleiche Wäsche mit Schwefelsäure nochmals wiederholt, bis die Salzsäure entfernt ist. Jetzt suspendiert man den zerriebenen Niederschlag in so viel Wasser von 25—30°, daß ein dünner Brei entsteht, fügt einen Überschuß von fein zerriebenem, kristallisiertem Barythydrat zu und rührt die Masse wieder bei 20—25° andauernd 12—15 Stunden, bis die Flüssigkeit freien Baryt enthält. Sie wird nun filtriert, der Baryt durch Kohlensäure gefällt und das Filtrat unter geringem Druck bei etwa 40° bis auf ungefähr 3 L eingedampft, wobei alles Ammoniak weggeht. Entsprechend der bekannten Vorschrift von Kossel zur Trennung von Histidin und Arginin, sättigt man nun die Lösung mit Kohlensäure und fällt das Histidin mit einer gesättigten Lösung von Quecksilberchlorid. Aus dem Filtrat wird das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff und das Chlor durch Silbernitrat entfernt, dann die Lösung mit überschüssigem Silbernitrat (etwa 300 g) versetzt und das Arginin durch kaltes, aber möglichst konzentriertes Barytwasser gefällt. Den sorgfältig gewaschenen Niederschlag suspendiert man nun in Wasser, zerlegt durch Schwefelwasserstoff, neutralisiert das Filtrat durch Salzsäure und verdampft unter einem Druck von 15—20 mm bis zum Sirup. Dieser wird direkt verestert, indem man ihn mit 1 L trocknem Methylalkohol übergießt und ohne Kühlung einen starken Strom von Salzsäuregas bis zur Sättigung einleitet. Man verdampft dann die Lösung wiederum unter einem Druck von 15—20 mm bis zum Sirup, gibt abermals 1 L Methylalkohol zu und wiederholt die Sättigung mit Salzsäure, um die Veresterung möglichst vollständig zu machen. Beim Abkühlen dieser Lösung tritt in der Regel schon die Kristallisation von salzsaurem Argininmethylester ein. Um die Abscheidung des Salzes zu erleichtern, fügt man noch die doppelte Menge Äther hinzu. Das Salz wird filtriert und ist in der Regel ganz rein. Die Mutterlauge wird stark eingeengt und wieder mit Äther versetzt, wobei eine zweite Kristallisation eintritt. Da dieses Produkt

etwas unreiner ist, so wird es in heißem Methylalkohol gelöst, mit Tierkohle gekocht und das Filtrat stark abgekühlt.

Die Ausbeute an reinem Hydrochlorat beträgt etwa 10% des angewandten Edestins.

Für die Analyse wurde bei 80° im Vakuum getrocknet.

0,2012 g Sbst.: 0,2374 g CO_2, 0,1223 g H_2O. — 0,1246 g Sbst.: 23,1 ccm N (19°, 765 mm). — 0,1015 g Sbst.: 0,1106 g AgCl.

$C_7H_{16}N_4O_2 . 2\,HCl$. Ber. C 32,18, H 6,89, N 21,45, Cl 27,20.
Gef. „ 32,18, „ 6,75, „ 21,47, „ 26,94.

Im Kapillarrohr rasch erhitzt, schmilzt das Salz unter starkem Schäumen gegen 195° (korr.). Es ist in Wasser sehr leicht, in kaltem Methylalkohol und heißem Äthylalkohol ebenfalls noch leicht, in den meisten anderen organischen Lösungsmitteln aber fast gar nicht löslich. Die wässerige Lösung reagiert auf Lakmus schwach sauer.

Der freie Argininmethylester ist noch viel empfindlicher als die Ester der anderen Diaminosäuren, so daß wir ihn im reinen Zustand bisher überhaupt nicht isolieren konnten.

Werden 5 g des Hydrochlorats mit 42 ccm der 2-prozentigen Lösung von Natrium im Methylalkohol geschüttelt, dann die Flüssigkeit mit der dreifachen Menge Äther versetzt und das Natriumchlorid abfiltriert, so enthält die Lösung freien Argininmethylester. Versetzt man sie mit Wasser, verdampft dann rasch den Methylalkohol unter sehr geringem Druck und erwärmt die wässerige Lösung eine Stunde auf 50°, so kann man durch Fällung mit Pikrinsäure daraus reichliche Mengen von Arginin gewinnen. Wird dagegen die methylalkoholisch-ätherische Lösung direkt unter geringem Druck verdampft, so bleibt ein wenig gefärbter, dicker Sirup zurück, der ganz andere Produkte enthält. Um die Umwandlung ganz zu vollziehen, läßt man den Sirup entweder 2 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur oder noch besser 24 Stunden bei 0° stehen. Wir konnten dann in reichlicher Menge eine Base in Form des Pikrats und des Nitrats isolieren, die wir anfänglich für das Dipeptid des Arginins hielten, die aber nach der Analyse des Nitrats eine erheblich größere Menge von Stickstoff enthält.

Um das Pikrat darzustellen, kann man den Sirup, der aus 5 g salzsaurem Argininmethylester erhalten wurde, direkt in etwa 50 ccm Wasser lösen, dann 7 g reine Pikrinsäure zugeben und bis zur vollständigen Lösung wieder erwärmen. Beim Erkalten scheidet sich das Pikrat kristallinisch ab. Es wird nach mehrstündigem Stehen der Flüssigkeit in Eis abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen. Die Ausbeute beträgt etwa 6 g. Es wurde zuerst aus der 10-fachen Menge warmem Wasser umkristallisiert und dann das reinere Produkt nochmals aus

viel heißem Wasser umgelöst. Für die Analyse wurde es zum drittenmal aus heißem Wasser kristallisiert und im Vakuum bei 80⁰ getrocknet.

Das Pikrat ist ein kristallinisches, zitronengelbes Pulver. Im Kapillarrohr erhitzt, fängt es gegen 200⁰ an, sich braun zu färben und zu sintern, und schmilzt gegen 218⁰ (korr.) unter Zersetzung. In Aceton löst es sich schon in der Kälte leicht. Etwas schwerer ist es in Methylalkohol und noch schwerer in kaltem Äthylalkohol löslich. In Äther, Benzol, Chloroform ist es fast unlöslich.

Dasselbe Pikrat erhält man, wenn der obenerwähnte, aus dem Argininmethylester erhaltene Sirup erst in 25 ccm $^1/_2$ *n*-Natronlauge gelöst, 2 Stunden stehen bleibt, um allen Ester zu verseifen, und dann die Flüssigkeit nach Neutralisation des Alkalis durch die entsprechende Menge *n*-Salzsäure mit Pikrinsäure, wie zuvor beschrieben ist, behandelt wird. Die Analyse des Pikrats gab folgende Zahlen:

0,1967 g Sbst.: 0,2523 g CO_2, 0,0649 g H_2O. — 0,1504 g Sbst.: 0,1936 g CO_2, 0,0461 g H_2O. — 0,1500 g Sbst.: 31,6 ccm N (24⁰, 762 mm). — 0,1144 g Sbst.: 24,0 ccm N (19⁰, 758 mm).

Gef. C 34,98, 35,11, H 3,66, 3,41, N 23,80, 24,04.

Die Werte passen ziemlich gut zu der Formel eines Arginylarginintripikrats, $(C_{12}H_{26}N_8O_3)(C_6H_3N_3O_7)_3$, welche verlangt C 35,39, H 3,44, N 23,4. Das gleiche gilt für die Bestimmung der Pikrinsäure in dem Salz, die ebenso ausgeführt wurde, wie bei dem Pikrat des Lysyl-lysins.

0,2150 g Sbst.: 0,145 g Pikrinsäure.

Ber. 67,55. Gef. 67,44.

Wie schon betont, sind aber die Analysen solcher komplizierten Pikrate wenig entscheidend.

Andere Resultate gab in der Tat das Nitrat.

Um dieses aus dem Pikrat herzustellen, wurden 5 g in 200 ccm 50-prozentigem Alkohol warm gelöst, nach dem Abkühlen 14,2 ccm *n*-Salpetersäure zugegeben und die Pikrinsäure durch wiederholtes Ausäthern entfernt. Nach dem Behandeln mit Tierkohle war die wässerige Lösung ganz farblos; sie wurde unter stark vermindertem Druck bei 30—40⁰ verdampft, wobei das Nitrat in farblosen, schönen Prismen auskristallisierte. Die Ausbeute betrug 1,1 g. Zur Reinigung wurde es in wenig warmem Wasser gelöst und die Flüssigkeit im Vakuumexsikkator eingedunstet. Die ausgeschiedenen schönen Kristalle wurden abgesaugt und erst mit wenig eiskaltem Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Man kann sie auch in Methylalkohol warm lösen und durch Zusatz von Äther wieder fällen. Für die Analyse wurde das Salz im Vakuum bei 80⁰ getrocknet.

0,1670 g Sbst.: 0,1624 g CO_2, 0,0773 g H_2O. — 0,1028 g Sbst.: 30,5 ccm N (22,5°, 759 mm). — 0,1404 g Sbst.: 0,1349 g CO_2, 0,0690 g H_2O. — 0,0854 g Sbst.: 25,4 ccm N (22°, 756 mm). — 0,1000 g Sbst.: 28,4 ccm N (13,5°, 765 mm). — 0,2074 g Sbst.: 0,2053 g CO_2, 0,0970 g H_2O.

$C_{12}H_{26}O_3N_8 + 3\,HNO_3$.

Ber.	C 27,74,	H 5,58,	N 29,67.
Gef.	„ 26,52, 26,14, 26,91,	„ 5,14, 5,43, 5,20,	„ 33,64, 33,68, 33,75.

Wie man sieht, stimmen die gefundenen Zahlen besonders für den Stickstoff recht schlecht mit den Werten, die für das Trinitrat des Arginyl-arginins berechnet sind. Wir haben deshalb noch die Menge der Salpetersäure nach der neuen schönen Methode von Busch[1]) mittels Nitron bestimmt.

0,1065 g	Sbst.:	0,2350 g	Nitronverbindung	= 37,07% HNO_3
0,1230 „	„	0,2580 „	„	= 35,24 „ „
0,1030 „	„	0,2215 „	„	= 36,13 „ „
0,1290 „	„	0,2919 „	„	= 38,01 „ „
0,1210 „	„	0,2610 „	„	= 36,24 „ „
			Durchschnitt:	36,54

$C_{12}H_{26}N_8O_3 + 3\,HNO_3$. Ber. 36,42. Gef. 36,54.

Da diese Zahlen merkwürdigerweise wieder ziemlich gut auf ein Trinitrat des Arginyl-arginins stimmen, so kamen wir auf den Gedanken, daß vielleicht die volumetrische Stickstoffbestimmung bei diesem sehr stickstoffreichen Salz unrichtige Werte gebe. Wir haben deshalb auch Bestimmungen nach Kjeldahl ausgeführt und zwar auf folgende Weise:

Ungefähr 0,2 g des Salzes wurden in 20 ccm Wasser gelöst, mit 2 ccm verdünnter Schwefelsäure (18%) versetzt und bei 15 mm Druck aus einem 45° warmen Bade bis zum dünnen Sirup verdampft, dann mit 10 ccm Wasser verdünnt, abermals verdampft und diese Operation nochmals wiederholt, bis das Destillat keine Spur von Salpetersäure mehr enthielt. Der ganz farblose Sirup wurde jetzt in 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure gelöst und nach Zusatz von 2 g Kaliumsulfat 4—5 Stunden gekocht, bis die Flüssigkeit ganz farblos geworden war. Jetzt wurde in gewöhnlicher Weise das gebildete Ammoniak bestimmt. Bei der zweiten Analyse war an Stelle des Kaliumsulfats die gleiche Menge trocknes Kupfersulfat verwandt worden.

Die so erhaltenen Mengen von Stickstoff stimmen nun mit den für Arginyl-arginin berechneten Zahlen merkwürdigerweise gut überein.

0,167 g Sbst.: 0,03668 g N = 21,96%. — 0,205 g Sbst.: 0,04508 g N = 21,99%.
Ber. Amid-Stickstoff 21,6%.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 38, 861 [1905].

Wie der Widerspruch zwischen den Resultaten der Methoden von Kjeldahl und derjenigen von Dumas zu erklären ist, können wir nicht sagen. Wir waren durch das Resultat der Kjeldahlschen Bestimmungen fast zu der Überzeugung gekommen, daß wir es mit Arginyl-arginin zu tun haben; aber leider hat die Prüfung des Körpers bei der Hydrolyse diese Hoffnung wieder sehr herabgesetzt, denn es ist uns durch Kochen des aus dem Pikrat dargestellten sirupförmigen Hydrochlorats mit starker Salzsäure bis jetzt nicht gelungen, Arginin zu regenerieren.

Das Nitrat bildet ziemlich große Prismen, die meist sternförmig verwachsen sind. Es ist in kaltem Wasser und warmem Methylalkohol ziemlich leicht, in Äthylalkohol aber sehr schwer löslich. Es gibt keine Biuretfärbung. Es schmilzt ziemlich scharf unter starkem Schäumen bei 189° (korr.).

Dasselbe Salz läßt sich mit Umgehung des Pikrats direkt aus dem Kondensationsprodukt des Argininesters gewinnen. Man löst zu dem Zweck das aus 5 g salzsaurem Argininmethylester erhaltene rohe Kondensationsprodukt in 50 ccm Wasser, fügt 14 ccm *n*-Salpetersäure zu und verdampft unter sehr geringem Druck bis zur Kristallisation. Die Ausbeute ist dann besser als beim Umwege über das Pikrat. Sie betrug bei obiger Menge 1,6 g.

Daß das Nitrat derselben Base zugehört wie das Pikrat, haben wir durch Rückverwandlung in dieses beweisen können. Man braucht zu dem Zweck nur das Nitrat in Wasser zu lösen und mit der berechneten Menge Natriumpikrat zu fällen.

Endlich haben wir uns überzeugt, daß der Argininäthylester bei 2-tägigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur in reichlicher Menge die gleiche Base liefert; daneben entsteht allerdings ein anderes Produkt, das ebenfalls ein gut kristallisierendes Pikrat gibt.

Isoseryl-isoserin-Methylester, $C_7H_{14}O_5N_2$.

Daß das Isoserin sich durch Alkohol und Salzsäure leicht verestern läßt, ist schon früher gezeigt worden[1]). Sein Äthylester konnte sogar kristallisiert erhalten werden, aber es ist schon damals bei der Sublimation des Produktes beobachtet worden, daß es gegen Wärme recht empfindlich ist und bereits bei 95° ziemlich rasch, teilweise unter Abspaltung von Alkohol, in ein kompliziertes Produkt verwandelt wird. Nach unseren Erfahrungen erleidet der Methylester die gleiche Veränderung noch viel rascher, denn er geht schon bei gewöhnlicher Tem-

[1]) E. Fischer und Leuchs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3795. (*S. 256.*)

peratur im Laufe von 1—2 Tagen zum größeren Teil in den Ester des Dipeptids über.

Für die Bereitung des Isoserin-methylesters werden 5 g gepulvertes Isoserin in 100 ccm trocknem Methylalkohol suspendiert und ohne Abkühlung trocknes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet, wobei klare Lösung stattfindet. Beim Verdampfen der Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck bleibt der salzsaure Ester als Sirup zurück. Um daraus den freien Ester ohne erheblichen Verlust zu gewinnen, haben wir den Sirup in 30 ccm Methylalkohol gelöst, in einer kleinen Menge dieser Flüssigkeit titrimetrisch das Chlor bestimmt und dann die Hauptmenge der Flüssigkeit mit der für das Chlor berechneten Quantität einer 2-prozentigen Auflösung von Natrium in Methylalkohol versetzt. Die Gesamtflüssigkeit wurde dann zur Fällung des Chlornatriums mit der gleichen Menge Äther versetzt und die sofort filtrierte Lösung unter geringem Druck aus einem Bade, das auf etwa 30° erwärmt war, verdampft. Dabei bleibt der freie Isoserin-methylester als farbloser, stark alkalischer Sirup zurück. Auf seine völlige Reinigung haben wir verzichtet. Läßt man diesen Sirup einige Tage bei Zimmertemperatur stehen, so verwandelt er sich in farblose Kristalle, die in Methyl- und Äthylalkohol schwer löslich sind und durch Waschen mit Äthylalkohol leicht gereinigt werden können. Die ziemlich großen Kristalle sind der Methylester des Isoserin-dipeptids. Die Ausbeute betrug 3,67 g aus 5 g Isoserin, mithin 75% der Theorie. Zur Reinigung wird das Produkt in wenig Wasser unter gelindem Erwärmen rasch gelöst und mit einem Gemisch von absolutem Alkohol und Aceton wieder gefällt. Für die Analyse wurde es nochmals in der gleichen Weise umkristallisiert und nach dem Waschen mit Alkohol und Äther bei 80° im Vakuum getrocknet.

0,1645 g Sbst.: 0,2470 g CO_2, 0,1031 g H_2O. — 0,1368 g Sbst.: 15,7 ccm N (15°, 756 mm).

$C_7H_{14}O_5N_2$. Ber. C 40,78, H 6,80, N 13,59.
Gef. „ 40,95, „ 6,95, „ 13,40.

Die Verbindung ist in Wasser leicht löslich und reagiert alkalisch. In Methyl- und Äthylalkohol löst sie sich selbst in der Wärme schwer; in Äther, Essigester und Benzol ist sie fast unlöslich. Sie gibt auch eine ziemlich starke Biuretfärbung. Einen Schmelzpunkt hat sie nicht; schon gegen 100° erfährt sie eine sichtbare Veränderung, und erst gegen 180° findet völlige Schmelzung statt.

Offenbar im Zusammenhang damit steht die Beobachtung, daß beim einstündigen Erhitzen des Isoserinmethylesters auf 100° ein anderes, noch höher schmelzendes Produkt (gegen 200°) entsteht, das wir nicht ganz rein gehabt haben, welches aber durch Behandlung mit

Alkali auch in das nachfolgend beschriebene Dipeptid des Isoserins übergeht und möglicherweise eine lactonähnliche Verbindung ist.

Durch 5-stündiges Kochen mit einem großen Überschuß von 10-prozentiger Salzsäure (40-fache Menge) wird der Isoseryl-isoserinester in die Aminosäure zurückverwandelt. Wir haben das Isoserin aus der salzsauren Lösung in bekannter Weise isoliert und 90% der Theorie erhalten.

Isoseryl-isoserin.

Der Ester wird in der 10-fachen Menge *n*-Natronlauge bei Zimmertemperatur gelöst und 3—4 Stunden aufbewahrt. Dann fügt man die dem Alkali genau entsprechende Menge verdünnter, farbloser Jodwasserstoffsäure zu, verdampft bei 10—20 mm Druck fast bis zur Trockne und kocht den Rückstand zur Entfernung des Jodnatriums mehrmals mit absolutem Alkohol aus. Hierbei bleibt das Dipeptid kristallinisch zurück. Es wird in Wasser gelöst, die Flüssigkeit mit etwas Tierkohle geklärt und das Filtrat durch absoluten Alkohol gefällt.

Für die Analyse wurde bei 80° im Vakuum getrocknet.

0,1125 g Sbst.: 0,1555 g CO_2, 0,0612 g H_2O. — 0,135 g Sbst.: 17,2 ccm N (23°, 758 mm).

$C_6H_{12}N_2O_5$. Ber. C 37,50, H 6,25, N 14,58.
Gef. „ 37,69, „ 6,04, „ 14,40.

Das Dipeptid löst sich leicht in Wasser, in Alkohol sehr schwer und in Äther, Benzol fast gar nicht. Aus der wässerigen Lösung durch Verdunsten oder Fällung mit Alkohol abgeschieden, bildet es ein farbloses, körniges Pulver, das keine deutliche Kristallform zeigt.

Es hat keinen scharfen Schmelzpunkt. Von 220° an beginnt es zu sintern und zersetzt sich bei höherer Temperatur unter Schwarzwerden. Die wässerige Lösung reagiert ziemlich stark sauer.

Wir betonen auch hier die Möglichkeit, daß das Präparat ein Gemisch von zwei Stereoisomeren war.

Serin-Methylester.

Das zu den folgenden Versuchen verwendete, synthetische, inaktive Serin verdanken wir den Herren Dr. Leuchs und Geiger, die im hiesigen Institut eine neue, recht brauchbare Methode für die Bereitung dieser wichtigen Aminosäure ausgearbeitet haben.

Suspendiert man 2 g fein gepulvertes Serin in 60 ccm trocknem Methylalkohol und leitet ohne Abkühlung trocknes Salzsäuregas bis zur Sättigung ein, so findet alsbald Lösung statt. Man verdampft schließlich unter stark vermindertem Druck aus einem Bade, dessen

Temperatur nicht über 50° geht, bis zum Sirup, der bald kristallinisch erstarrt. Die Kristalle werden mit wenig Äthylalkohol vermischt, abgesaugt und mit Alkohol, später mit Äther, gewaschen. Die Ausbeute betrug 2,6 g oder 80% der Theorie. Für die Analyse wurde das Präparat in warmem Methylalkohol gelöst, durch Zusatz von Äther wieder abgeschieden und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1106 g Sbst.: 0,1018 g AgCl. — 0,1512 g Sbst.: 11,8 ccm N (19°, 749 mm).

$C_4H_9NO_3.HCl$. Ber. N 9,00, Cl 22,83.
Gef. „ 8,87, „ 22,76.

Das Salz ist in Wasser äußerst leicht löslich. Auch von Methylalkohol wird es ziemlich leicht, von Äthylalkohol aber schon schwerer aufgenommen; in Äther und Petroläther ist es fast unlöslich. Aus Methylalkohol scheidet es sich bei langsamem Zusatz von Äther allmählich in farblosen, durchsichtigen Kristallen ab, die unter dem Mikroskop entweder als schiefe sechsseitige Tafeln oder als zugespitzte Prismen erscheinen. Es schmilzt nicht scharf gegen 114° (korr.), und die farblose Flüssigkeit zersetzt sich bei höherer Temperatur unter Gasentwickelung und Bräunung.

Zur Bereitung des freien Esters werden 2 g des Hydrochlorats in 20 ccm Methylalkohol gelöst und die berechnete Menge (14,7 ccm) einer 2-prozentigen Auflösung von Natrium in trocknem Methylalkohol zugegeben. Um das Chlornatrium abzuscheiden, fügt man noch etwa 40 ccm Äther zu, läßt eine halbe Stunde stehen und verdampft dann die filtrierte Lösung unter sehr geringem Druck bei gewöhnlicher Temperatur. Hierbei bleibt der Serinmethylester als farbloser, stark alkalisch reagierender Sirup zurück, der sich äußerst leicht zum Diketopiperazinderivat kondensiert.

Serin-anhydrid.

Läßt man den freien Serinester 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen oder erhitzt ihn 2—3 Stunden auf 35—40°, so verwandelt er sich in ein farbloses, kristallinisches Produkt, das mit wenig Methylalkohol erwärmt und nach dem Erkalten abfiltriert wird. Die Ausbeute beträgt 55—65% der Theorie, berechnet auf das angewandte salzsaure Salz. Das Produkt ist, wie schon erwähnt, ein Gemisch von zwei isomeren Serinanhydriden. Zu ihrer Trennung benutzt man die verschieden rasche Kristallisation aus warmem Wasser. Man löst also das Rohprodukt in wenig heißem Wasser, klärt mit Tierkohle, filtriert heiß und läßt abkühlen. Dabei fällt zuerst die Verbindung A in mikroskopisch kleinen, meist vierseitigen, schiefen Tafeln aus. Später erscheinen die langen, schmalen, zugespitzten Prismen des Isomeren B. Sobald dies

eintritt, filtriert man rasch. Der zuerst ausgeschiedene Körper wird dann in der gleichen Weise umkristallisiert und so nach ein- bis zweimaligem Umlösen rein erhalten.

Serinanhydrid A. Für die Analyse wurde das Präparat mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 100⁰ getrocknet.

0,1406 g Sbst.: 0,2144 g CO_2, 0,0735 g H_2O. — 0,1032 g Sbst.: 14,5 ccm N (18⁰, 747 mm).

$C_6H_{10}N_2O_4$. Ber. C 41,38, H 5,75, N 16,09.
Gef. „ 41,58, „ 5,81, „ 15,98.

Es ist in warmem Wasser leicht, in kaltem Wasser erheblich schwerer löslich. Die Löslichkeit nimmt dann sukzessive ab für Methylalkohol, Äthylalkohol, Aceton; in Äther und Benzol ist es fast unlöslich. Die wässerige Lösung reagiert fast neutral. Es hat keinen bestimmten Schmelzpunkt. Gegen 265⁰ (korr.) fängt es im Kapillarrohr an braun zu werden und zersetzt sich gegen 280⁰ (korr.) unter Schäumen und Dunkelfärbung.

Serinanhydrid B. Es findet sich in der wässerigen Mutterlauge, die nach dem Auskristallisieren des Isomeren hinterbleibt. Wird diese weiter eingedampft, so scheidet es sich beim Abkühlen in Eis in den oben erwähnten Formen ab, anfangs gewöhnlich gemischt mit einer kleineren Menge des Isomeren; durch systematisches Umlösen kann es aber verhältnismäßig leicht getrennt werden. Wie schon erwähnt, kristallisiert es in mikroskopisch feinen, dünnen und meist zugespitzten Prismen oder Nadeln. Zum Unterschied von dem Isomeren hat es einen Schmelzpunkt. Bei raschem Erhitzen im Kapillarrohr schmilzt es bei 226⁰ (korr.) zu einer wenig gefärbten Flüssigkeit, die sich aber gleich nachher unter Gasentwickelung zersetzt. Für die Analyse war ebenfalls bei 100⁰ getrocknet.

0,1713 g Sbst.: 0,2592 g CO_2, 0,0903 g H_2O. — 0,1254 g Sbst.: 17,5 ccm N (18⁰, 747 mm).

$C_6H_{10}N_2O_4$. Ber. C 41,38, H 5,75, N 16,09.
Gef. „ 41,27, „ 5,86, „ 15,88.

In der Löslichkeit unterscheidet es sich wenig von dem Isomeren.

Seryl-serin.

Von verdünntem Alkali werden die Serinanhydride ziemlich rasch gelöst, offenbar unter Bildung von Dipeptiden. Da wir nicht genug Material hatten, um die beiden isomeren Anhydride getrennt zu behandeln, so benutzten wir für einen größeren Versuch ein Gemisch.

1 g desselben wurde mit 10 ccm *n*-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt. Nach einer Stunde war schon klare Lösung

eingetreten. Nach weiteren zwei Stunden wurde diese mit der auf die Natronlauge berechneten Menge Essigsäure neutralisiert, durch Schütteln mit etwas Tierkohle geklärt und das Filtrat auf dem Wasserbade zum dünnen Sirup eingedampft. Beim Verreiben mit absolutem Alkohol verwandelte er sich zum größten Teil in eine kristallinische Masse. Sie wurde filtriert und zur völligen Entfernung des Natriumacetats nochmals mit absolutem Alkohol ausgekocht.

Zur weiteren Reinigung lösten wir das Produkt in wenig heißem Wasser und fügten in der Wärme die doppelte Menge Alkohol hinzu. In dem mikrokristallinischen Pulver unterscheidet man, wenn es langsam ausgefallen ist, zweierlei Formen; die einen sind ziemlich breite, aber zugespitzte, vielfach sternförmig verwachsene Blätter; sie bilden die Hauptmenge. Daneben befinden sich feine, fächerartig gruppierte Nadeln. Durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol verschwinden die letzteren, und das Produkt sieht dann einheitlich aus. Wir vermuten deshalb, daß ursprünglich zwei Dipeptide durch Aufspaltung der isomeren Anhydride entstanden waren, von denen aber das eine, in geringerer Menge vorhandene, durch Kristallisation entfernt wurde.

Für die Analyse wurde das zuletzt erhaltene, einheitlich aussehende Präparat bei 80—90° getrocknet. Die Ausbeute betrug 50% des angewandten Anhydrids.

0,1903 g Sbst.: 0,2643 g CO_2, 0,1126 g H_2O. — 0,1529 g Sbst.: 19,2 ccm N (19°, 767 mm).

$C_6H_{12}N_2O_5$. Ber. C 37,50, H 6,25, N 14,58.
Gef. „ 37,87, „ 6,57, „ 14,50.

Das Seryl-serin fängt beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen 200° an braun zu werden und zersetzt sich gegen 210° (korr.) unter Schäumen. Es löst sich in warmem Wasser leicht, in kaltem Wasser etwas schwerer und in Alkohol sehr schwer. Die wässerige Lösung reagiert ziemlich stark sauer und löst, zum Unterschied vom Anhydrid, Kupferoxyd in der Wärme sehr rasch mit schön blauer Farbe. Mit Methylalkohol und Salzsäure läßt es sich leicht verestern. Das Esterchlorhydrat kristallisiert in sehr kleinen, meist sternförmig verwachsenen, spießartigen Nadeln.

---

35. Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden. XI[1]).

Liebigs Annalen der Chemie **340**, 123 (1905).
(Eingegangen am 2. April.)

Der Aufbau der Polypeptide aus den Aminosäuren und den halogenhaltigen Säurechloriden ist praktisch so leicht auszuführen, daß es lohnend schien, die Methode auf zahlreiche Fälle anzuwenden. Denn die Kenntnis sehr verschiedener Glieder der Klasse kann sowohl für das Studium der Abbauprodukte der Proteïne, als auch für deren spätere Synthese von Nutzen sein, da es nach den Beobachtungen von Abderhalden und mir[2]) möglich ist, mit Hilfe der Fermente die biologisch wertvollen Formen auszuwählen. Andererseits bieten die Polypeptide in noch höherem Maße wie die Kohlehydrate Gelegenheit, wichtige Schlußfolgerungen der Stereochemie zu prüfen, da bei den höheren Formen die Zahl der asymmetrischen Kohlenstoffatome sehr groß wird und außerdem die Gelegenheit zur Bildung und zur Aufspaltung von Piperazinringen ein neues Moment für die sterische Anordnung mit sich bringt. Ich habe deshalb viele jüngere Herren im hiesigen Institut an diesen Untersuchungen teilnehmen lassen und will die Resultate in größeren Abhandlungen, die eine abgekürzte Darstellung gestatten und doch den Anteil des einzelnen klar erkennen lassen, zusammenfassen.

Im folgenden sind nach den Versuchen, die ich durch die Herren Axhausen, Brunner, Warburg, Kölker, Raske und Schmidlin ausführen ließ, eine Reihe von neuen Di- und Tripeptiden beschrieben, die sich von Glykocoll, Alanin, α-Aminobuttersäure, Leucin, Asparagin, Asparaginsäure und Phenylglykocoll ableiten. Zu ihrem Aufbau dienten außer den schon früher benutzten Halogenfettsäuren als neuer Komponent die Phenylbromessigsäure, deren Chlorid die Einführung des Phenylglycyls, $C_6H_5CH(NH_2).CO$, gestattet (Schmidlin).

Wie früher dargelegt wurde[3]), ist beim Aufbau von Polypeptiden mit zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen aus inaktiven Kompo-

---

[1]) Die vorhergehenden Abhandlungen finden sich in den Berichten d. d. chem. Gesellsch. 1903—1905.

[2]) Sitzungsber. d. Berliner Akademie d. Wiss. 1905.

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2486 [1904]. (*S. 337.*)

nenten die Bildung von zwei stereoisomeren Racemkörpern möglich. Der erste Fall dieser Art ist in der Abhandlung VI[1]) beim Leucylphenylalanin beschrieben worden. Dazu kommen jetzt fünf neue Beispiele: Leucylalanylglycin (Axhausen), Alanylleucin (Warburg), α-Aminobutyryl-α-aminobuttersäure (Raske), Phenylglycylalanin (Schmidlin) und Leucylisoserin (Kölker), und es verdient hervorgehoben zu werden, daß in den vier ersten Fällen die Trennung der Isomeren schon bei den halogenhaltigen Produkten, z. B. dem Brompropionylleucin gelungen ist. Solche Stereoisomeren als α- und β-Verbindungen zu bezeichnen, wie es in der Abhandlung VI geschah, ist nicht allgemein durchführbar und auch nicht zweckmäßig, da diese Buchstaben für die Unterscheidung von Strukturisomeren gebräuchlich und für den Zweck bei den einzelnen Dipeptiden, sowie bei den bromhaltigen Vorstufen unentbehrlich sind. Ich schlage deshalb vor, die Stereoisomerie hier vorläufig durch die Buchstaben A und B usw., die dem Namen angehängt werden, zu unterscheiden. Diese Bezeichnung wird überflüssig werden, sobald die Konfiguration der Körper festgestellt ist, weil dann die üblichen Buchstaben *d* und *l* benutzt werden können.

Den jetzt vorliegenden Beispielen von Stereoisomerie stehen allerdings eine größere Anzahl von früher beschriebenen Fällen gegenüber, in denen die Isolierung von Isomeren nicht gelang, und wo es unentschieden bleibt, ob die Produkte Gemische sind, oder ob nur eine der beiden möglichen Formen bei der Synthese entsteht. Weitere Beispiele dieser Art findet man im folgenden bei dem Alanylleucylglycin (Brunner) und dem Leucylalanin (Warburg); dagegen kann man das α-Bromisocapronylisoserin (Kölker), aus dem die beiden Leucylisoserine entstehen, mit Bestimmtheit als ein Gemisch von zwei Isomeren ansehen. Der gleiche Schluß gilt wohl auch für das Phenylbromacetylasparagin und die Phenylbromacetylasparaginsäure, sowie die daraus entstehenden Phenylglycylverbindungen (Schmidlin), die alle vier je einen optisch aktiven und einen racemischen Komponenten enthalten; denn die Verhältnisse liegen hier genau so, wie bei den in Abhandlung VIII [2]) beschriebenen α-Bromisocapronyl- und Leucylderivaten des Asparagins und der Asparaginsäure.

Optisch aktive Polypeptide sind bisher nur aus den aktiven Aminosäuren bereitet worden. Dahin gehören die Derivate des Tyrosins[3]) und Cystins[4]), sowie die eben erwähnten Kombinationen des Asparagins

---

[1]) H. Leuchs und U. Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3306.
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4590 [1904]. (*S. 410.*)
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2493 [1904]. (*S. 344.*)
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 4575 [1904]. (*S. 395.*)

und der Asparaginsäure. Bei Anwendung racemischer Säurechloride sind die Produkte aber Gemische zweier aktiver Formen, die erst durch Kristallisation getrennt werden müssen. Die Lösung der letzten Aufgabe ist übrigens bis jetzt nur in einem Falle, beim Bromisocapronylasparagin durchgeführt und dürfte häufig auf große Schwierigkeiten stoßen. Einfacher wird das Problem bei Anwendung optisch aktiver Halogenfettsäuren, vorausgesetzt, daß diese sich ohne Racemisierung mit den Aminosäuren zu Polypeptiden verkuppeln lassen. Die Brauchbarkeit dieses Verfahrens wird für einen Fall durch die Versuche von Warburg bewiesen, der mit dem Chlorid der aktiven α-Brompropionsäure ein aktives Alanylglycin aufbauen konnte. Allerdings ist letzteres kein Derivat des natürlichen und biologisch interessanteren *d*-Alanins, sondern der *l*-Verbindung. Aber prinzipiell macht das keinen Unterschied und es unterliegt keinem Zweifel, daß man auf die gleiche Art in der Spiegelbildreihe zu dem *d*-Alanylglycin gelangen kann. Leider ist die Abscheidung der rein aktiven Halogenfettsäuren aus den Racemkörpern eine sehr mühsame Arbeit, weil ihre Salze mit den gebräuchlichen aktiven Alkaloïden große Neigung zur Bildung von Mischkristallen haben und außerdem noch durch heißes Wasser langsam zersetzt werden. Herr Warburg mußte deshalb die Kristallisation des Cinchoninsalzes der α-Brompropionsäure, aus dem Ramberg schon eine Säure mit der spezifischen Drehung $-7{,}6^0$ erhalten hat, nicht weniger als 20-mal unter besonderen Vorsichtsmaßregeln wiederholen, bevor er eine Säure mit der spezifischen Drehung $-26{,}7^0$ gewann, die durch die Verwandlung in aktives Alanin als nahezu rein gekennzeichnet wurde. Leichter, aber weniger rein, ließ sich die gleiche Säure aus dem *d*-Alanin durch Brom- und Stickoxyd gewinnen, und da sie nach Warburgs Versuchen durch Ammoniak in *l*-Alanin verwandelt wird, so liegt hier der gleiche Übergang von einem aktiven Körper zum optischen Antipoden vor, den P. Walden[1]) bei der Asparagin- und Äpfelsäure entdeckt hat.

Ob die Verwendung aktiver Halogenfettsäuren zum Aufbau aktiver Polypeptide bequemer ist, als die Benutzung der kürzlich von mir aufgefundenen Chloride der Aminosäuren[2]), die auch in aktiver Form zu erhalten sind, müssen vergleichende Versuche erst entscheiden. Vermutlich werden beide Methoden nötig sein, um alle wünschenswerten Kombinationen zu ermöglichen.

Die Dipeptide der α-Aminosäuren gehen beim Schmelzen in Anhydride über, die ich bisher auch Diacipiperazine genannt habe. Nach

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **28**, 2766; **29**, 133.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 605. (*S. 423.*)

dem Vorschlage von A. Hantszch[1]), der die Silbe „Aci" für andere Zwecke reservieren will, werde ich sie aber in Zukunft mit dem Namen „Diketopiperazine" bezeichnen. Aus der Strukturformel erkennt man leicht, daß solche Piperazinderivate mit Seitenketten zwei verschiedenen Dipeptiden entsprechen. Die erste experimentelle Bestätigung dafür geben das Leucylglycin (Brunner) und das Glycylleucin (Warburg), die beim Schmelzen das gleiche Anhydrid — Isobutyldiketopiperazin — liefern. Ob letzteres beim Aufspalten mit Säuren oder Alkalien wieder beide Dipeptide gibt, ist noch zu prüfen. Anders liegen die Verhältnisse bei den beiden stereoisomeren α-Aminobutyryl-α-aminobuttersäuren. Wenn man ihre Verwandlung in das Diketopiperazin am Modell verfolgt, so findet man zwei Isomere, eine Cis- und eine Transform. In Wirklichkeit scheint aber aus beiden das gleiche Produkt zu entstehen (Raske). Sollte eine sorgfältigere Untersuchung dieses Resultat bestätigen, so liegt die Vermutung nahe, daß die hohe Temperatur im einen Falle eine Umlagerung verursacht hat und es wird dann für die Stereochemie der Diketopiperazine interessant sein, ihre Entstehung aus den Estern der Dipeptide bei niedriger Temperatur zu studieren.

Eine genaue Besprechung verdient noch die Isomerie der Leucylisoserine (Kölker), denn sie könnte auch durch eine Verschiedenheit der Struktur, entsprechend den beiden Formeln

$$\text{I.}\quad C_4H_9.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CHOH.COOH\,,$$

$$\text{II.}\quad C_4H_9.CH(NH_2).COO.\underset{\displaystyle CH_2.NH_2}{\underset{|}{CH}}.COOH\,,$$

bedingt sein. Diese Möglichkeit war um so mehr zu berücksichtigen, als Th. Curtius[2]) für das aus Hippurazid und Isoserin erhaltene Produkt die Formel

$$C_6H_5.CO.NHCH_2.COO.\underset{\displaystyle CH_2.NH_2}{\underset{|}{CH}}.COOH$$

aufgestellt hat.

Wären die Leucylisoserine im Sinne obiger Formeln verschieden, so dürfte man einen erheblichen Unterschied besonders in der Basizität und der dadurch bedingten Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure, sowie in der Einwirkung der salpetrigen Säure erwarten. Der Versuch hat aber gezeigt, daß dies nicht der Fall ist, daß sich vielmehr beide

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 998.

[2]) Journ. f. prakt. Chem. [2] **70**, 195 [1904].

Körper genau so wie die gewöhnlichen Dipeptide verhalten (Kölker). Es liegt darum kein Grund vor, ihnen eine andere Struktur zuzuschreiben, und wir betrachten sie deshalb als Stereoisomere mit der gleichen obigen Strukturformel I.

1. Alanyl-glycin und Leucyl-alanyl-glycin;

von Walter Axhausen.

Um die drei Aminosäuren miteinander zu verkuppeln, wurde nach der bekannten Methode das Glykocoll zuerst in die α-Brompropionylverbindung verwandelt und das hieraus entstehende Alanylglycin wiederum mit α-Bromcapronylchlorid kombiniert. Der Theorie entsprechend entstanden im letzten Falle zwei isomere Körper.

α-Brompropionyl-glycin, $CH_3.CHBr.CO.NH.CH_2.COOH$.

10 g Glycin wurden in 134 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst, in einer Kältemischung recht stark gekühlt und unter kräftigem Schütteln 200 ccm ($1^1/_2$ Mol.) *n*-Natronlauge und 34 g (1,2 Mol.) Brompropionylbromid in je acht Portionen zugefügt. Nach dem Verschwinden des Bromidgeruches wurde mit 40 ccm verdünnter Salzsäure (etwa fünffach normal) angesäuert und das Ganze unter stark vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mehrmals mit warmem Äther extrahiert, die Ätherauszüge eingeengt und mit Petroläther versetzt. Die Ausbeute betrug 25,8 g oder 92% der Theorie an Rohprodukt. Sie wird aber bei ungenügender Kühlung erheblich schlechter.

Zur Analyse wurde mehrmals aus der zehnfachen Menge heißem Chloroform umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1693 g gaben 9,7 ccm Stickgas bei 17⁰ und 759 mm Druck.
0,1381 „ „ 0,1242 AgBr.

	Berechnet für $C_5H_8O_3NBr$ (Molgew. 210)	Gefunden
N	6,67	6,59
Br	38,10	38,27

Aus heißem Chloroform kristallisiert die Verbindung in farblosen, meist zu kugeligen Aggregaten vereinigten Blättchen, die gegen 100^0 zu sintern anfangen und bei 104^0 (korr.) schmelzen.

Sie ist in Wasser, Alkohol und Äther leicht löslich, recht schwer in kaltem Chloroform, fast unlöslich in Petroläther.

α-Brompropionyl-glycinäthylester, $CH_3.CHBr.CO.NH.CH_2.COOC_2H_5$.

Am bequemsten wird er aus Glykocollester, dessen Hydrochlorat jetzt käuflich ist, gewonnen. Es ist dabei nicht nötig, den Glykocollester zu isolieren, sondern man kann direkt die ätherische Lösung benutzen, die bei der Darstellung des freien Esters aus dem Hydrochlorat nach E. Fischer[1]) erhalten wird und durch Natriumsulfat scharf getrocknet ist. Auf ein Mol. Bromid sind selbstverständlich zwei Mol. Ester notwendig. Da die Reaktion ziemlich lebhaft ist, so verdünnt man das Bromid ebenfalls mit dem doppelten Volumen trocknem Äther und läßt dieses Gemisch langsam zu der gekühlten und stark bewegten ätherischen Lösung des Glykocollesters zufließen, bis eine filtrierte Probe nicht mehr durch das Bromid getrübt wird. Auf 80 g Glykocollesterchlorhydrat wurden ungefähr 50 g Brompropionylbromid verbraucht.

Nach beendigter Operation läßt man noch eine Stunde bei 0° stehen, filtriert dann vom Glykocollesterbromhydrat ab, verdampft den größten Teil des Äthers und versetzt den Rückstand mit Petroläther. Dabei fällt gewöhnlich der Brompropionylglycinester zuerst als Öl, erstarrt aber nach kurzer Zeit kristallinisch. Die Ausbeute beträgt etwa 80% der Theorie.

Zur Analyse wurde das Produkt aus der zehnfachen Menge warmen Wassers umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2037 g gaben 10,5 ccm Stickgas bei 17,5° und 763 mm Druck.
0,1396 g „ 0,1098 AgBr.

	Berechnet für $C_7H_{12}O_3NBr$ (Molgew. 238)	Gefunden
N	5,88	5,95
Br	33,61	33,47

Der Ester ist leicht löslich in Alkohol und Äther, schwer in kaltem Wasser, sehr schwer in Petroläther. Er kristallisiert besonders schön aus heißem Ligroïn in langen, seideglänzenden, weichen Nadeln, die bei 53° sintern und bei 55° (korr. 55,5°) schmelzen.

Durch verdünntes Alkali wird er leicht verseift. Will man auf diese Art das Brompropionylglycin darstellen, so schüttelt man 10 g des gepulverten Esters mit 46 ccm (1,1 Mol.) *n*-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur, wobei schon nach 5—10 Minuten Lösung erfolgt, versetzt dann mit 46 ccm *n*-Salzsäure, verdampft unter stark

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 436 [1901]. (*S. 177.*)

vermindertem Druck zur Trockne, extrahiert den Rückstand mit trocknem Äther und fällt die stark eingeengte ätherische Lösung mit Petroläther. Die Verseifung des Esters erfolgt unter diesen Bedingungen so glatt, daß man mehr als 85% der Theorie an Brompropionylglycin erhält.

Alanyl-glycin, $CH_3.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.COOH$.

Wird das Brompropionylglycin mit der fünffachen Menge wässerigem Ammoniak von 25% im geschlossenen Rohre 20 Minuten auf 100° erhitzt, so ist alles Brom abgespalten. Man verdampft die Lösung auf dem Wasserbade, zuletzt unter Zusatz von etwas Alkohol, um alles Wasser zu entfernen, und laugt den kristallinischen Rückstand mit heißem absoluten Alkohol aus. Verwendet man auf 5 g Brompropionylglycin 60 ccm Alkohol, so geht bei längerem Digerieren alles Bromammonium in Lösung. Nach dem Erkalten wird das Dipeptid filtriert, in möglichst wenig heißem 50-prozentigen Alkohol gelöst und die filtrierte Lösung heiß mit absolutem Alkohol bis zur Trübung versetzt. Bei längerem Stehen kristallisiert das Alanylglycin fast vollständig in weißen, kurzen Nädelchen, die meist zu kugeligen Aggregaten so dicht verwachsen sind, daß die kristallinische Struktur schwer erkennbar ist. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 87% der Theorie.

Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohre schmilzt es gegen 228° (korr. 235°) unter Bräunung und lebhafter Gasentwickelung. Es ist in Wasser spielend löslich, in Alkohol, Äther usw. fast unlöslich.

Es reagiert schwach sauer und löst Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe.

Zur Analyse wurde es noch einmal, wie oben angegeben, umkristallisiert und bei 100° getrocknet.

0,1655 g gaben 0,2483 CO_2 und 0,1036 H_2O.
0,1674 g „ 27,3 ccm Stickgas bei 16° und 763 mm Druck.

	Berechnet für $C_5H_{10}O_3N_2$ (Molgew. 146)	Gefunden
C	41,10	40,92
H	6,85	6,95
N	19,18	18,97

Carbäthoxyl-alanyl-glycin,

$C_2H_5.CO_2.NH.CH(CH_3).CO.NHCH_2.COOH$.

1,5 g Alanylglycin wurden in 10 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst, auf 0° gekühlt, 1,2 g (1,1 Mol.) chlorkohlensaures Äthyl hinzugegeben und stark geschüttelt. Nach Zusatz von 0,6 g wasserfreier Soda, die in

wenig Wasser gelöst war, wurde noch weitere 30 Minuten kräftig geschüttelt, nach dem Ansäuern mit 11 ccm *n*-Salzsäure unter stark vermindertem Druck verdampft und der trockne Rückstand mit warmem Essigäther ausgelaugt. Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels kristallisierten beim Behandeln mit Petroläther 2 g des Carbäthoxylderivates oder 89% der Theorie.

Zur Analyse war aus wenig heißem Wasser umgelöst und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2355 g gaben 0,3787 CO_2 und 0,1331 H_2O.
0,2276 g „ 25,7 ccm Stickgas bei 16,5° und 754 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{14}O_5N_2$ (Molgew. 218)	Gefunden
C	44,04	43,86
H	6,42	6,28
N	12,84	12,94

Die Verbindung löst sich sehr leicht in Alkohol, etwas schwerer in kaltem Wasser, Essigäther und Aceton, sehr schwer in Äther und Petroläther. Sie kristallisiert in weißen, zusammengewachsenen, biegsamen Nädelchen, die bei 117° zu sintern beginnen und bei 120° (korr. 122°) schmelzen. Die wässerige Lösung reagiert sauer und löst Kupferoxyd mit grünblauer Farbe.

α-Bromisocapronyl-alanyl-glycin,

$C_4H_9.CHBr.CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH_2.COOH$.

Theoretisch sind für die Synthese gleiche Moleküle Dipeptid und α-Bromisocapronylchlorid erforderlich. Ein Überschuß des letzteren ist aber für die Ausbeute günstig und auch ratsam, da das Chlorid viel leichter zu beschaffen ist, als das Dipeptid. Dem entspricht folgende Vorschrift:

3 g Alanylglycin werden in 20 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst und zu der stark gekühlten Flüssigkeit 60 ccm (3 Mol.) *n*-Natronlauge und 9 g (2 Mol.) α-Bromisocapronylchlorid in je sechs Portionen abwechselnd und unter kräftigem Schütteln zugefügt. Das Schütteln ist fortzusetzen, bis der Geruch des Chlorids verschwunden ist. Das beim Ansäuern mit 12 ccm verdünnter Salzsäure (fünffach normal) ausfallende Öl wird ausgeäthert, der Äther verdampft und der Bromkörper durch Behandeln mit Petroläther zum Kristallisieren gebracht, wobei die Bromcapronsäure in Lösung bleibt.

Die Ausbeute betrug 5,7 g oder 85% der Theorie.

Beim Umkristallisieren aus der zehnfachen Menge heißem Wasser wurden feine, farblose Nadeln erhalten, die nach dem Trocknen im Va-

kuum über Schwefelsäure folgende für obige Formel gut passende Werte gaben:

0,1781 g gaben 13,1 ccm Stickgas bei 14⁰ und 759 mm Druck.
0,2012 g ,, 0,1170 AgBr.

	Berechnet für $C_{11}H_{19}O_4N_2Br$ (Molgew. 323)	Gefunden
N	8,67	8,59
Br	24,77	24,75

Wie aber der ganz unscharfe Schmelzpunkt schon anzeigt, ist das Präparat ein Gemisch von zwei isomeren Körpern, die sich am leichtesten durch Äther trennen lassen. Für diesen Zweck werden 10 g des fein gepulverten Gemisches mit 120 ccm absolutem Äther geschüttelt, dann filtriert und der Rückstand nochmals in der gleichen Weise mit 100 ccm Äther behandelt. Der ungelöste Teil, der ungefähr die Hälfte des Ausgangsmaterials beträgt, wird dann aus der fünffachen Menge heißem Essigäther umkristallisiert und diese Operation wiederholt, bis der Schmelzpunkt konstant bleibt.

Die Ausbeute an reinem Präparate betrug 2,6 g. Es kristallisiert in farblosen, feinen Nadeln. Im Kapillarrohre erhitzt, beginnt es bei 150⁰ zu sintern und schmilzt vollständig bei 154⁰ (korr. 157⁰).

Im Gegensatze dazu zeigte das obenerwähnte analysierte Gemisch schon unter 100⁰ beginnende Sinterung und gegen 135⁰ völlige Schmelzung.

Dieses reine, hochschmelzende Bromcapronylalanylglycin entspricht dem nachfolgenden Leucyl-alanyl-glycin A.

Das isomere, in Äther leicht lösliche Bromisocapronylalanylglycin konnte nicht kristallisiert erhalten werden. Aus der stark eingeengten ätherischen Lösung fiel es durch Petroläther als dickes Öl, das erst nach längerem Reiben fest wurde, aber amorph blieb. Beim abermaligen Lösen in Äther blieb wieder ein kleiner Rückstand und der beim Verdampfen des ätherischen Filtrates resultierende Sirup wurde nun direkt zur Darstellung des Tripeptids B verwendet, das schön kristallisiert und deshalb leicht zu reinigen ist.

Leucyl-alanyl-glycin,

$C_4H_9.CH(NH_2).CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH_2.COOH.$

Das Bromcapronylalanylglycin verliert beim Erhitzen mit der fünffachen Menge wässerigem Ammoniak von 25% im geschlossenen Rohre auf 100⁰ schon nach 20—25 Minuten alles Halogen und das Tripeptid läßt sich nach dem Verdampfen der Lösung durch Alkohol

leicht vom Bromammonium trennen. Verwendet man die rohe Bromverbindung, so erhält man ein Gemisch der beiden isomeren Tripeptide. Wird dieses durch Lösen in heißem Wasser und Abscheiden mit Alkohol umkristallisiert, so erkennt man unter dem Mikroskop deutlich zwei verschiedene Formen: äußerst feine, lange, zu Büscheln vereinigte Nadeln und kurze, derbe, meist zu Drusen verwachsene, schräg abgeschnittene Prismen.

Will man die beiden Isomeren getrennt haben, so ist es nötig, von den gereinigten Bromverbindungen auszugehen.

Leucyl-alanyl-glycin A. Es entsteht aus dem bei 154° schmelzenden Bromisocapronylalanylglycin in der oben geschilderten Weise und bleibt beim Auslaugen des Verdampfungsrückstandes mit Alkohol oder wenig kaltem Wasser zurück. Zur völligen Reinigung wurde es in der 30-fachen Menge heißem Wasser gelöst und diese Lösung mit dem 3-fachen Volumen Alkohol versetzt. Das Tripeptid schied sich dann in den zuvor erwähnten feinen, zu Büscheln verwachsenen Nadeln ab, die gegen 259° (korr.) unter Zersetzung schmolzen. Zur Analyse war noch einmal in derselben Weise umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1446 g gaben 0,2700 CO_2 und 0,1050 H_2O.
0,2086 g „ 29,7 ccm Stickgas bei 21° und 756 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{21}O_4N_3$ (Molgew. 259)	Gefunden
C	50,96	50,92
H	8,11	8,07
N	16,22	15,97

Die Verbindung verlangt von heißem Wasser ungefähr 30 Teile zur Lösung. In Alkohol ist sie noch viel schwerer löslich und in Äther so gut wie unlöslich. Von Mineralsäuren und Alkalien wird sie leicht aufgenommen. Sie ist fast geschmacklos und ihre wässerige Lösung reagiert auf blaues Lackmus schwach sauer. Die alkalische Lösung gibt mit wenig Kupfersalz eine violettblaue Färbung.

Leucyl-alanyl-glycin B. Für seine Bereitung diente das in Äther leicht lösliche amorphe Bromisocapronylalanylglycin. Die Behandlung mit Ammoniak und die Trennung des Tripeptids vom Bromammonium geschah in der oben angegebenen Weise. Zur völligen Reinigung wurde das Tripeptid in der zehnfachen Menge heißem Wasser gelöst und diese Lösung mit dem zehnfachen Volumen Alkohol versetzt. Es scheidet sich dann in mikroskopischen, kurzen, ziemlich dicken und schräg abgeschnittenen Prismen, die meist zu Drusen verwachsen sind, ab. Im Gegensatz zu der Verbindung A schmilzt es unter Zersetzung schon gegen 233° (korr.), schmeckt kaum und löst sich bereits

in ungefähr zehn Teilen kochendem Wasser; im übrigen gleicht es jenem vollkommen. Für die Analyse war ebenfalls über Schwefelsäure getrocknet.

0,1061 g gaben 0,1975 CO_2 und 0,0793 H_2O.
0,2068 g „ 28,9 ccm Stickgas bei 18,5° und 761 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{21}O_4N_3$ (Molgew. 259)	Gefunden
C	50,96	50,77
H	8,11	8,30
N	16,22	16,00

Zur weiteren Charakterisierung der beiden Tripeptide können die Benzoylverbindungen dienen, die ebenfalls in bezug auf Schmelzpunkt, Löslichkeit, Kristallform und Kristallwassergehalt deutliche Unterschiede zeigen.

Benzoylleucyl-alanyl-glycin A. 1 g Tripeptid A wurde mit 20 ccm Wasser übergossen, 2,3 g Natriumbicarbonat zugefügt und allmählich unter starkem Schütteln bei Zimmertemperatur 1,7 g (3 Mol.) Benzoylchlorid hinzugegeben. Nachdem der Geruch des Benzoylchlorids verschwunden war, wurde mit Salzsäure angesäuert und der entstandene weiße, kristallinische Niederschlag nach einiger Zeit abgesaugt, mit etwas Wasser gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Zur Entfernung der Benzoësäure wurde mehrmals mit absolutem Äther ausgelaugt und der getrocknete Rückstand (1,3 g) in der 45-fachen Menge siedendem Wasser gelöst. In der Kälte fielen 0,7 g aus, teils in langen, vierseitigen Tafeln, teils in zusammengewachsenen Blättchen.

Da aus der Mutterlauge durch Einengen noch 0,2 g gewonnen werden konnten, so betrug die Gesamtausbeute an reinem Material 0,9 g oder 65% der Theorie.

Die lufttrockne Substanz verliert beim Erhitzen auf 110° im Vakuum ein Mol. Kristallwasser, den allergrößten Teil davon auch schon im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure.

0,1565 g, lufttrocken, gaben bei 110° im Vakuum 0,0075 H_2O ab.

	Berechnet für $C_{18}H_{25}O_5N_3 + H_2O$ (Molgew. 381)	Gefunden
H_2O	4,72	4,79

0,1618 g, wasserfrei, gaben 0,3522 CO_2 und 0,1018 H_2O.
0,1490 g, „ „ 15,4 ccm Stickgas bei 24° und 764 mm Druck.

	Berechnet für $C_{18}H_{25}O_5N_3$ (Molgew. 363)	Gefunden
C	59,50	59,37
H	6,89	6,99
N	11,57	11,51

Die Substanz ist sehr leicht löslich in Alkohol, viel schwerer in Wasser und Essigäther, sehr schwer in Äther und Petroläther. Sie schmilzt scharf bei 190—191° (korr. 194,5° bis 195,5°).

Benzoylleucyl-alanyl-glycin B. Die Darstellung war genau so wie bei der vorhergehenden Verbindung und die Ausbeute betrug 72% der Theorie. Aus der 100-fachen Menge kochendem Wasser umgelöst wird sie in feinen, langen, meist zu Büscheln verwachsenen farblosen Nadeln erhalten, die kein Kristallwasser enthalten und bei 204 bis 205° (korr. 209° bis 210°) schmelzen.

Sie ist leicht löslich in Alkohol, bedeutend schwerer in Wasser und Essigäther, fast unlöslich in Äther, Chloroform und Petroläther.

Zur Analyse wurde sie noch einmal aus etwa der 100-fachen Menge heißem Wasser umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1415 g gaben 0,3094 CO_2 und 0,0893 H_2O.
0,1389 g ,, 14,4 ccm Stickgas bei 22,5° und 764 mm Druck.

	Berechnet für $C_{18}H_{25}O_5N_3$ (Molgew. 363)	Gefunden
C	59,50	59,63
H	6,89	7,01
N	11,57	11,66

Im Anschluß an obige Verbindungen mögen noch einige Carbäthoxylderivate des Alanins und Alanylglycins beschrieben werden, die ebenfalls nach den bekannten allgemeinen Methoden gewonnen werden.

Carbäthoxyl-alanin, $C_2H_5.CO_2.NH.CH.(CH_3).COOH$.

2 g inaktives Alanin wurden in 23 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst, auf 0° abgekühlt, 2,7 g chlorkohlensaures Äthyl (1,1 Mol.) zugegeben und stark geschüttelt. Nach ca. fünf Minuten wurden 1,2 g (1/2 Mol.) trocknes Natriumcarbonat — in 6 ccm Wasser gelöst — hinzugefügt und wiederum kräftig geschüttelt, bis der Geruch des Esters verschwunden war. Nach dem Ansäuern mit 24 ccm *n*-Salzsäure wurde die Lösung unter stark vermindertem Druck zur Trockne verdampft, der Rückstand mehrmals mit warmem Äther ausgezogen und das beim Verdampfen des Äthers zurückbleibende Öl mit Petroläther behandelt, bis es kristallisierte. Die Ausbeute betrug 3,0 g oder 85% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wird die Substanz in wenig Äther gelöst und durch Petroläther wieder abgeschieden. Sie bildet dann farblose Blättchen, die bei 84° (korr.) schmelzen.

Sie ist in den gebräuchlichen Lösungsmitteln, außer Petroläther, sehr leicht löslich. Sie wurde zur Analyse noch einmal in Äther gelöst,

mit Petroläther wieder abgeschieden und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2092 g gaben 0,3415 CO_2 und 0,1294 H_2O.
0,1868 g „ 14,3 ccm Stickgas bei 20° und 753 mm Druck.

	Berechnet für $C_6H_{11}O_4N$ (Molgew. 161)	Gefunden
C	44,72	44,52
H	6,83	6,87
N	8,70	8,61

Carbäthoxyl-alanin-äthylester.

Er wird am leichtesten durch Einwirkung von Chlorkohlensäureäther auf die wässerige Lösung des Alaninesters bei Gegenwart von Natriumcarbonat gewonnen. Dementsprechend werden 10 g Alanin mit 50 g Alkohol und trocknem Salzsäuregas verestert, dann die Lösung unter stark vermindertem Druck zum Sirup verdampft und um die Salzsäure möglichst zu entfernen, nach dem Lösen des Rückstandes in Alkohol wieder verdampft. Schließlich bleibt das Hydrochlorat des Alaninesters kristallinisch zurück. Das Salz wird in ca. 20 ccm Wasser gelöst, gut gekühlt, 11,6 ccm zehnfach *n*-Natronlauge zugegeben, und dann 12,8 g chlorkohlensaures Äthyl langsam unter kräftigem Schütteln zugesetzt. Um den durch die Reaktion entstehenden salzsauren Alaninester zu zerlegen, fügt man allmählich noch 6,4 g wasserfreies Natriumcarbonat, das in 32 ccm Wasser gelöst ist, hinzu und schüttelt weiter, bis der Chlorkohlensäureester verschwunden ist. Dann wird die Masse zweimal ausgeäthert, die Auszüge mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther verdampft. Wird das zurückbleibende Öl bei 10 mm Druck fraktioniert, so geht der Ester bei 123° (Quecksilberfaden ganz im Dampf) über. Ausbeute 12 g. Für die Analyse wurde die Substanz noch einmal im Vakuum destilliert.

0,1818 g gaben 0,3385 CO_2 und 0,1323 H_2O.
0,2400 g „ 15,2 ccm Stickgas bei 19,7° und 756 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{15}O_4N$ (Molgew. 189)	Gefunden
C	50,79	50,78
H	7,94	8,09
N	7,41	7,35

Der Ester kristallisiert nach längerem Stehen in der Kälte in zu Warzen vereinigten langen Nadeln, die bei 25° (korr.) schmelzen. Er ist leicht löslich in Äther, viel schwerer in Petroläther, sehr schwer in kaltem Wasser.

Durch Schütteln mit etwas mehr als einem Mol. *n*-Natronlauge bei Zimmertemperatur wird er rasch gelöst und in Carbäthoxylalanin

verwandelt, das sich aus der Lösung nach genauem Neutralisieren der Natronlauge durch *n*-Salzsäure in der zuvor beschriebenen Weise mit einer Ausbeute von 86% der Theorie isolieren läßt.

Carbäthoxyl-alaninamid, $C_2H_5.CO_2.NH.CH(CH_3).CO.NH_2$.

2,5 g Carbäthoxylalaninester wurden mit 25 ccm bei 0⁰ gesättigtem alkoholischen Ammoniak im geschlossenen Rohre 24 Stunden auf 100⁰ erhitzt. Beim Verdampfen der Lösung blieb das Amid nebst etwas unverändertem Ester als Kristallmasse zurück, die in 10 ccm warmem Essigäther gelöst wurde. In der Kälte schied sich das Amid in schönen, weißen, zu Büscheln vereinigten, kurzen, derben Nadeln ab, während der unveränderte Ester in der Mutterlauge blieb. Die Ausbeute betrug 1,5 g oder $^2/_3$ der Theorie.

Zur Analyse wurde mehrmals aus der fünffachen Menge warmem Essigäther umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1847 g gaben 0,3035 CO_2 und 0,1261 H_2O.
0,1609 g „ 25,3 ccm Stickgas bei 23,2⁰ und 753 mm Druck.

	Berechnet für $C_6H_{12}O_3N_2$ (Molgew. 160)	Gefunden
C	45,00	44,82
H	7,50	7,59
N	17,50	17,36

Die Substanz schmilzt bei 118—119⁰ (korr. 120—121⁰).

Sie ist in Wasser und Alkohol sehr leicht löslich, schwerer in kaltem Essigäther, sehr schwer in Äther und Petroläther.

Carbäthoxyl-alanylchlorid.

Diese leicht veränderliche und deshalb auch nicht analysierte Substanz entsteht aus Carbäthoxylalanin und Thionylchlorid. Erwärmt man 10 g des ersteren mit 8 g Thionylchlorid auf etwa 40⁰, so tritt bald Lösung ein, während gleichzeitig Schwefeldioxyd und Salzsäure entweichen. Nach Beendigung der Gasentwickelung wird das überschüssige Thionylchlorid im Vakuum bei möglichst niederer Temperatur abdestilliert, wobei das Chlorid als schwach gelb gefärbte Masse zurückbleibt.

Carbäthoxyl-alanyl-glycinester, $C_2H_5.CO_2.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH_2.CO_2.C_2H_5$.

Das nach obiger Vorschrift bereitete Carbäthoxylalanylchlorid wird in 70 ccm trocknem Äther gelöst und unter Kühlung tropfenweise zu einer Lösung von 12,5 g (2 Mol.) Glycinester in 25 ccm getrocknetem

Äther hinzugegeben. Nach einer Stunde wird vom ausgeschiedenen salzsauren Glykocollester abfiltriert, mehrmals mit Äther nachgewaschen, dann das Filtrat stark eingeengt und mit Petroläther versetzt. Dabei fällt die neue Verbindung erst als Öl, erstarrt aber bald kristallinisch. Sie wird filtriert, dann in warmem Äther gelöst und die etwas eingeengte Lösung nach Einimpfen eines Kriställchens in einer Kältemischung gekühlt, worauf eine reichliche Kristallisation von langen, farblosen, biegsamen Nadeln erfolgt.

Die Ausbeute betrug 12 g oder 80% der Theorie. Der Ester sintert bei 65° und schmilzt bei 67° (korr. 67,5°). Zur Analyse wurde er noch einmal aus Äther umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1463 g gaben 0,2606 CO_2 und 0,0988 H_2O.
0,1000 g „ 9,9 ccm Stickgas bei 21° und 761 mm Druck.

	Berechnet für $C_{10}H_{18}O_5N_2$ (Molgew. 246)	Gefunden
C	48,78	48,58
H	7,32	7,50
N	11,38	11,18

Der Ester ist leicht löslich in Alkohol und Wasser, schwerer in kaltem Äther, sehr schwer in Petroläther.

Die Verseifung des Esters gelingt leicht durch Schütteln mit etwas mehr als der berechneten Menge *n*-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur und es entsteht in guter Ausbeute dasselbe Carbäthoxylalanylglycin, welches durch Einwirkung von Chlorkohlensäureäther auf Alanylglycin erhalten wurde und oben beschrieben worden ist.

Carbäthoxyl-alanyl-glycinamid,

$C_2H_5.CO_2.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH_2.CO.NH_2$.

3 g Ester wurden mit dem gleichen Volumen flüssigem Ammoniak im Rohre 24 Stunden bei Zimmertemperatur liegen gelassen. Nach dem Verdunsten des Ammoniaks blieb ein dicker Sirup, der bald zu kristallisieren begann. Er wurde in 25 ccm warmem Aceton gelöst. Beim Abkühlen auf 0° kristallisierten 1,3 g des Amids in zu Garben vereinigten, weißen Nadeln. Aus der Mutterlauge konnten durch Zusatz von Äther noch 0,8 g gewonnen werden, so daß die Gesamtausbeute 2,1 g oder 81% der Theorie betrug.

Das Amid beginnt bei 114° zu sintern und schmilzt bei 117° (korr. 119°). Es ist in Wasser leicht löslich, schwerer in kaltem Alkohol und Aceton, sehr schwer in Äther und Petroläther. Mit Kupfersulfat und Natronlauge gibt die wässerige Lösung eine blauviolette Färbung.

Zur Analyse wurde es aus wenig heißem Alkohol umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1356 g gaben 0,2192 CO_2 und 0,0850 H_2O.
0,1677 g „ 28,3 ccm Stickgas bei 18° und 758 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{15}O_4N_3$ (Molgew. 217)	Gefunden
C	44,24	44,09
H	6,91	6,96
N	19,35	19,29

2. Leucyl-glycin und Alanyl-leucyl-glycin

von Arnold Brunner.

Die Vereinigung des Glykocolls mit dem Bromisocapronylchlorid und die nachfolgende Verwandlung des Bromkörpers in Leucylglycin sind so leicht auszuführen und geben so gute Ausbeute, daß dieses Dipeptid nächst dem Glycylglycin von allen Gliedern der Klasse am leichtesten zugänglich ist.

α-Bromisocapronyl-glycin,

$(CH_3)_2.CH.CH_2.CHBr.CO.NH.CH_2.COOH$.

10 g Glykocoll wurden in 133 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst, und unter kräftigem Umschütteln abwechselnd 220 ccm *n*-Natronlauge und 34 g (1,2 Mol.) α-Bromisocapronylchlorid portionenweise zugesetzt wobei jedesmal mit der Zugabe erst fortgefahren wurde, wenn die suspendierten Öltropfen und der Säurechloridgeruch verschwunden waren. Der Prozeß dauerte etwa 45 Minuten.

Die Flüssigkeit wurde nun mit 45 ccm fünffach normaler Salzsäure versetzt, das ausfallende Öl mit Äther aufgenommen und die eingeengte ätherische Lösung durch Petroläther gefällt. Das anfangs ausfallende Öl erstarrte bald kristallinisch. Es wurde filtriert und zur Entfernung der anhaftenden Bromcapronsäure mit Petroläther gewaschen. Ausbeute 30 g oder 89% der Theorie, berechnet auf das Glykocoll. Sie stieg bei einem anderen Versuche auf 92%, als während der Operation die Flüssigkeit durch eine Kältemischung sorgfältig gekühlt war. Allerdings dauerte dafür der Prozeß auch fast doppelt so lange. Da das Bromisocapronylchlorid viel teurer ist als Glykocoll, so wird man bei größeren Operationen am besten die Aminosäure im Überschuß anwenden.

Das Bromcapronylglycin ist in Petroläther fast unlöslich, in Wasser, Benzol, Toluol, Chloroform schwer löslich, in Aceton, Alkohol, Essigäther und Äther leicht löslich. Es kann aus heißem Chloroform (zirka

20 Volumteile) oder Toluol (zirka 14 Volumteile) bequem umkristallisiert werden.

Doch zeigte das so gewonnene Präparat, dessen Schmelzpunkt bei 133° (korr.) lag, bei der Analyse etwas zu hohen Bromgehalt und enthielt in der Tat eine Verunreinigung, die schon beim kurzen Kochen mit Wasser eine erhebliche Menge von Bromwasserstoff gab. Zur völligen Reinigung des Bromisocapronylglycins ist deshalb Umkristallisieren aus etwa 15 Teilen heißem Wasser nötig. Es fällt daraus beim Erkalten anfangs ölig, erstarrt aber bald zu kleinen, dünnen Nadeln, die meist konzentrisch verwachsen sind und bei 135° (korr.) schmelzen. Beim Umlösen aus heißem Wasser bleibt eine erhebliche Menge (15 bis 20%) in Lösung. Will man diese gewinnen, so ist es ratsam, die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck einzudampfen, weil beim langen Kochen mit Wasser Zersetzung unter Bildung von Bromwasserstoff eintritt.

Zur Analyse war im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1844 g gaben 0,2572 CO_2 und 0,0924 H_2O.
0,2159 g „ 10,4 ccm Stickgas bei 18° und 762 mm Druck.
0,2240 g „ 0,1678 AgBr.

	Berechnet für $C_8H_{14}NO_3Br$ (Molgew. 252)	Gefunden
C	38,10	38,04
H	5,56	5,57
N	5,56	5,58
Br	31,75	31,88

Leucyl-glycin, $(CH_3)_2.CH.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.COOH$.

Zur Verwandlung in das Dipeptid wird das α-Bromisocapronylglycin in fünf Volumteilen wässerigem Ammoniak von 25% Gehalt gelöst. Man kann dafür den rohen Bromkörper verwenden, vorausgesetzt, daß er durch Waschen mit Petroläther sorgfältig von der Bromisocapronsäure befreit ist. Die Abspaltung des Broms durch das Ammoniak findet bei 100° schon im Laufe einer halben Stunde statt. Für die Ausbeute ist es aber besser, daß die Reaktion sich bei gewöhnlicher Temperatur vollzieht. Man läßt deshalb vier Tage stehen, verdampft dann auf dem Wasserbade, zuletzt unter Zusatz von etwas Alkohol, um alles Wasser zu entfernen, und kocht den trocknen Rückstand mit Alkohol aus, bis er kein Brom mehr enthält. Dadurch werden nicht allein das Bromammonium, sondern auch geringe Mengen einer organischen Bromverbindung, die manchmal dem Dipeptid beigemengt ist, entfernt. Die Ausbeute an so gereinigtem Dipeptid betrug 62% des Bromkörpers oder 83% der Theorie.

Zur Reinigung läßt sich das Dipeptid aus ungefähr der 15-fachen Menge heißem Wasser umkristallisieren, wobei etwa die Hälfte in der Mutterlauge bleibt und durch Einengen oder Fällen mit überschüssigem Alkohol zurückgewonnen werden kann.

Die Substanz scheidet sich aus heißem Wasser bei raschem Erkalten meist in mikroskopisch kleinen, teils vierseitig schiefen, teils sechseckigen Tafeln aus; bei ungestörter, langsamer Kristallisation kann sie in schönen, großen Kristallen erhalten werden.

Das zweimal aus heißem Wasser umgelöste Dipeptid schmolz bei raschem Erhitzen im Kapillarrohre gegen 235° (korr. 243°) unter Aufschäumen und Gelbfärbung. Dabei entsteht das unten beschriebene Anhydrid.

Zur Analyse war im Exsikkator getrocknet.

0,1609 g gaben 0,3020 CO_2 und 0,1230 H_2O.
0,1831 g „ 24,1 ccm Stickgas bei 22° und 761 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{16}O_3N_2$ (Molgew. 188)	Gefunden
C	51,06	51,19
H	8,51	8,49
N	14,89	14,93

Das Dipeptid ist in den gebräuchlichen indifferenten organischen Lösungsmitteln nahezu unlöslich. Auch von heißem Wasser braucht es fast die 15-fache Menge. Diese Lösung reagiert schwach sauer. Es schmeckt schwach bitter. Von Alkalien und Säuren wird es leicht aufgenommen.

Leucyl-glycinkupfer.

Wird eine recht verdünnte wässerige Lösung von Leucylglycin einige Stunden mit überschüssigem, gefälltem Kupferoxyd auf dem Wasserbade erwärmt und filtriert, so entsteht eine dunkelblaue Lösung, die beim Einengen schon in ziemlicher Verdünnung glänzende, tiefblaue Kristalle abscheidet, die sofort rein sind. Das Salz erfordert in der Hitze und in der Kälte ungefähr gleich viel, nämlich 60—70 Teile Wasser zur Lösung. In absolutem Alkohol und Aceton ist es so gut wie unlöslich, von heißem Methylalkohol wird es merklich gelöst.

Zur Analyse diente die lufttrockne Substanz. Die Zahlen führen zu der einfachsten Formel

$$C_8H_{16}O_4N_2Cu \quad \text{oder} \quad \underset{\text{(Leucylglycin)}}{C_8H_{16}O_3N_2} + CuO$$

0,2324 g gaben 0,0693 CuO.
0,2232 g „ 0,0661 CuO.
0,1945 g „ 0,2546 CO_2 und 0,1050 H_2O.

	Berechnet für $C_8H_{16}O_4N_2Cu$ (Molgew. 267,5)	Gefunden	
Cu	23,74	23,82	23,65
C	35,89	35,70	—
H	5,98	6,00	—

Das Salz enthält aber Kristallwasser, das teilweise schon im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure und vollständig bei 80° im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid entweicht. Auf obige Formel berechnet entspricht seine Menge nur $^1/_2$ Mol. H_2O. Und diese war auch nicht größer, als die Temperatur bei der Trocknung im Vakuum auf 120° und ohne Vakuum auf 140° gesteigert wurde.

I. 0,2723 g verloren bei 80° im Vakuum über P_2O_5 0,0093 g.
II. 0,2311 g „ „ 125° 0,0072 g.
III. 0,2723 g „ „ 120° im Vakuum über P_2O_5 0,0098 g.
IV. 0,1948 g „ „ 140° 0,0066 H_2O.

	Berechnet für $C_8H_{16}O_4N_2Cu$	Gefunden I.	II.	III.	IV.
$^1/_2$ H_2O	3,36	3,42	3,12	3,60	3,39

Die Temperatur noch höher zu steigern ging nicht an, da bei 150° schon tiefer greifende Zersetzung wahrnehmbar war.

Entsprechend obigen Daten ist also vorläufig die Formel des Kupfersalzes zu schreiben:

$$(C_8H_{15}O_3N_2Cu)_2O + H_2O.$$

Leucyl-glycinanhydrid.

```
(CH3)2CH.CH2CH–NH–CO
            |       |
            CO–NH–CH2
```

(Isobutyldiketopiperazin).

Wie zuvor erwähnt, geht das Leucylglycin beim Schmelzen unter Braunfärbung und Gasentwickelung in sein Anhydrid über.

Bei Anwendung von 3 g Dipeptid und einer Temperatur des Bades von 235—240° war die Verwandlung nach 15 Minuten beendet und der Gewichtsverlust entsprach fast genau einem Mol. Wasser. Die beim Erkalten strahlig-kristallinisch erstarrte, hellrotbraune Masse wurde zerkleinert, in 120 ccm heißem Alkohol gelöst und mit Tierkohle gekocht. Das gelbe Filtrat schied beim Erkalten mikroskopisch kleine, zentrisch angeordnete Nadeln ab, die nach dem Absaugen eine völlig farblose, verfilzte Masse bildeten. Ihr Gewicht betrug 1,8 g. Aus der Mutterlauge ließen sich durch Einengen noch weitere 0,4 g gewinnen. Die Ausbeute betrug demnach 81% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wurde die Substanz aus der etwa 40-fachen Menge heißem Wasser umkristallisiert und zur Analyse bei 110° getrocknet, wobei der lufttrockne Körper aber nicht an Gewicht verlor.

Aus heißem Wasser kristallisiert er beim Erkalten langsam in großen, derben Prismen, die unter dem Mikroskop oft zwillingsartige Bildungen zeigen. Die wässerige Lösung reagiert neutral und löst beim Kochen kein Kupferoxyd. Das Anhydrid schmilzt bei 239° (korr. 245°). Von kaltem Wasser wird es schwer benetzt.

0,1803 g gaben 0,3723 CO_2 und 0,1341 H_2O.
0,1692 g „ 24,7 ccm Stickgas bei 23° und 762 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{14}O_2N_2$ (Molgew. 170)	Gefunden
C	56,47	56,31
H	8,24	8,26
N	16,47	16,50

Dieselbe Verbindung entsteht aus dem Leucylglycinester sehr leicht durch alkoholisches Ammoniak[1]).

Die trockne Substanz erscheint infolge der langsamen Benetzung durch Wasser anfangs geschmacklos, später kommt ein intensiv bitterer Nachgeschmack zur Geltung.

Carbäthoxyl-leucyl-glycin,

$C_4H_9.CH(NHCO_2C_2H_5).CO.NH.CH_2.COOH$.

1,9 g (1 Mol.) Leucylglycin werden in 10 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst, auf 0° abgekühlt und unter Umschütteln 1,2 g (1,1 Mol.) chlorkohlensaures Äthyl zugegeben. Nach etwa fünf Minuten fügt man 0,5 g (1/2 Mol.) wasserfreie Soda — in wenig Wasser gelöst — hinzu und schüttelt 1/2 Stunde lang. Dann wird die Carbäthoxylverbindung durch 11 ccm *n*-Salzsäure in Freiheit gesetzt und sofort ausgeäthert. Auf Zusatz von überschüssigem Petroläther zur ätherischen Lösung fällt ein Öl aus, das bald kristallinisch erstarrt und abgesaugt wird. Die Ausbeute betrug 2,1 g oder 80% der Theorie. Zur Reinigung wurde die Substanz zweimal aus der fünffachen Menge heißem Wasser umgelöst. Beim Erkalten fiel sie anfangs ölig aus, kristallisierte aber bald in Form von mikroskopisch kleinen, meist zu zentrischen Bündeln vereinigten Nadeln.

Zur Analyse war über Schwefelsäure getrocknet.

0,1650 g gaben 0,3061 CO_2 und 0,1152 H_2O.
0,1664 g „ 15,8 ccm Stickgas bei 21,5° und 761 mm Druck.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 38, 618 [1905]. (*S. 435.*)

	Berechnet für $C_{11}H_{20}O_5N_2$ (Molgew. 260)	Gefunden
C	50,77	50,60
H	7,69	7,76
N	10,77	10,80

Das Carbäthoxylderivat sintert bei 123° und schmilzt bei 125° (korr. 127°) zu einer farblosen, klaren Flüssigkeit. Es wird leicht gelöst von kaltem Alkohol, ebenso in der Hitze von Wasser, Chloroform und Toluol, dagegen schwer von Äther, kaltem Wasser, Chloroform und Toluol, fast gar nicht von Petroläther.

Benzoyl-leucyl-glycin,

$C_4H_9.CH(NH.COC_6H_5)CO.NH.CH_2.COOH.$

3 g Leucylglycin wurden in 90 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 10 g Natriumcarbonat allmählich 6,7 g (3 Mol.) Benzoylchlorid unter Umschütteln bei gewöhnlicher Temperatur hinzugefügt. Der Prozeß dauerte etwa eine Stunde. Dann wurde mit Salzsäure angesäuert, der kristallinische Niederschlag abgesaugt, getrocknet und zur Entfernung der Benzoësäure mehrmals mit Äther extrahiert. Die Ausbeute an Benzoylkörper betrug 3,5 g, d. h. 75% der Theorie. Zur Reinigung wurde er zweimal aus der etwa 45-fachen Menge heißem Wasser umkristallisiert.

Er fällt bei langsamem Erkalten in zentimeterlangen, zu Bündeln vereinigten Nadeln aus, die bei 163° (167° korr.) schmelzen, nachdem sie einige Grade vorher zu sintern begannen.

Zur Analyse war über Schwefelsäure getrocknet.

0,2149 g gaben 0,4838 CO_2 und 0,1353 H_2O.
0,1526 g „ 13 ccm Stickgas bei 20,5° und 758 mm Druck.

	Berechnet für $C_{15}H_{20}O_4N_2$ (Molgew. 292)	Gefunden
C	61,64	61,40
H	6,85	7,00
N	9,59	9,74

Die Verbindung löst sich fast gar nicht in Äther und Petroläther, schwer in Chloroform und Benzol, leicht in Alkohol.

α-Brompropionyl-leucyl-glycin.

Da das Brompropionylbromid beim Zusammentreffen mit der alkalischen Lösung des Leucylglycins teilweise in Brompropionsäure verwandelt wird, so ist es für die Ausnützung des wertvolleren Dipeptids vorteilhaft, einen erheblichen Überschuß von Säurebromid anzuwenden.

Dem entsprechend wurden 12 g Leucylglycin in 63 ccm *n*-Natronlauge (1 Mol.) gelöst, und unter Kühlung mit Kältemischung und kräftigem Schütteln abwechselnd 210 ccm *n*-Natronlauge und 27,6 g (2 Mol.) Brompropionylbromid portionenweise hinzugefügt. Die Dauer der Operation betrug 15 Minuten. Dann wurden 42 ccm fünffach *n*-Salzsäure zugesetzt, wobei erst ein Öl ausfiel, das aber bald kristallisierte und dann die Flüssigkeit breiartig erfüllte. Nach mehrstündigem Stehen bei 0^0 wurde abgesaugt.

Die Ausbeute betrug 18,5 g oder 90% der Theorie, berechnet auf das Dipeptid. Die Reinigung geschah durch Umkristallisieren aus der zehnfachen Menge heißem Wasser. Der Körper fiel nach dem Abkühlen in Form mikroskopisch kleiner, meist zu zentrischen Bündeln verwachsener Nadeln aus, die die ganze Flüssigkeit breiartig erfüllten. Die Menge ging dabei auf 15 g zurück.

Zur Analyse wurde nochmals aus Wasser umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet.

0,3136 g gaben 24,5 ccm Stickgas bei 24^0 und 763 mm Druck.
0,2029 g „ 0,1186 AgBr.

	Berechnet für $C_{11}H_{19}O_4N_2Br$ (Molgew. 323)	Gefunden
N	8,67	8,80
Br	24,77	24,87

Die Substanz sintert bei 160^0 und schmilzt bei 161^0 (korr. 165^0) zu einer farblosen Flüssigkeit, die gleich darauf unter Gasentwickelung braun wird. Sie hat bittersauren, zusammenziehenden Geschmack und saure Reaktion; sie löst sich leicht in Alkohol und Aceton, ziemlich leicht in heißem Essigäther, schwer in Äther und kaltem Wasser; in Chloroform und Benzol ist sie auch in der Hitze schwer löslich, in Petroläther so gut wie unlöslich.

Sie macht den Eindruck eines einheitlichen Körpers; immerhin darf man nicht vergessen, daß sie doch noch ein Gemisch von zwei sehr ähnlichen Isomeren sein könnte. Das gleiche gilt natürlich auch für das folgende Tripeptid.

Alanyl-leucyl-glycin,

$NH_2CH(CH_3).CO.NH.CH(C_4H_9)CO.NH.CH_2COOH$.

15 g α-Brompropionylleucylglycin bleiben gelöst in der fünffachen Menge wässerigem Ammoniak von 25% einige Tage stehen. Dann wird die Lösung auf dem Wasserbade stark eingedampft. Beim Übergießen des Rückstandes mit Alkohol beginnt bald die Kristallisation des Tripeptids. Der Alkohol wird größtenteils abgedampft und durch

frischen ersetzt. Nach einiger Zeit wird die abgekühlte Flüssigkeit filtriert und das ungelöste Tripeptid bis zur Entfernung des Bromammoniums mit absolutem Alkohol gewaschen.

Die Ausbeute betrug 8,9 g oder 74% der Theorie. Sie war ebenso groß, als das Brompropionylleucylglycin mit dem Ammoniak im geschlossenen Rohre 20 Minuten auf 100⁰ erwärmt wurde.

Zur Reinigung löst man das Tripeptid in der vierfachen Menge heißem Wasser und fällt durch die 20-fache Menge heißen Alkohol. Zur Analyse wurde noch einmal in derselben Weise umgelöst und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1579 g gaben 0,2958 CO_2 und 0,1163 H_2O.
0,1653 g „ 23,4 ccm Stickgas bei 23⁰ und 766 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{21}O_4N_3$ (Molgew. 259)	Gefunden
C	50,97	51,09
H	8,11	8,18
N	16,22	16,08

Das Alanylleucylglycin schmilzt bei raschem Erhitzen im Kapillarrohre gegen 232⁰ (korr.) unter Gasentwickelung und Bräunung. Es ist leicht löslich in Wasser, fast unlöslich in den üblichen indifferenten organischen Lösungsmitteln. Aus nicht zu konzentrierter wässeriger Lösung wird es durch nicht zuviel Alkohol sehr langsam in großen, äußerst feinen, biegsamen, oft zu zentrischen Bündeln vereinigten Nadeln gefällt. Es schmeckt schwach bitter. Seine wässerige Lösung zeigt schwach saure Reaktion und löst Kupferoxyd in der Hitze mit blauer Farbe.

3. Glycyl-leucin, Alanyl-leucin, Leucyl-alanin, Glycyl-alanyl-leucin und aktives Alanyl-glycin

von Otto Warburg.

Da die Einführung des Halogenfettsäureradikals immer in gleicher Weise geschah, so genügt es, die allgemeine Vorschrift voranzusetzen und in den speziellen Fällen nur die Mengenverhältnisse anzugeben.

Man löst die Aminosäure (resp. das Peptid) in der berechneten Menge *n*-Natronlauge, kühlt und gibt das Chlorid (Bromid) abwechselnd mit überschüssiger *n*-Natronlauge so hinzu, daß die Flüssigkeit stets alkalisch reagiert. Nach dem Eintragen des Chlorids wird jedesmal kräftig geschüttelt, bis der Geruch danach verschwunden ist. Bei der Reaktion wird Wärme frei, man kühlt deshalb die Schüttelflasche sowie die einzutragende Natronlauge mit Kältemischung. Die Temperatur wird hierdurch auf 0—10⁰ gehalten. Zum Schluß wird mit verdünnter Salzsäure übersättigt.

Inaktives α-Brompropionyl-leucin,
$CH_3.CHBr.CO.NH.CH.(C_4H_9)COOH$.

Angewandt 20 g Leucin (synthetisch), gelöst in 160 ccm *n*-Natronlauge. Dazu 66 g Brompropionylbromid (ca. 2 Mol.) und 540 ccm *n*-Natronlauge (ca. 3,5 Mol.). Der Überschuß des billigen Säurechlorids ist wegen der größeren Ausbeute ratsam. Zum Schluß wird mit 60 ccm fünffach *n*-Salzsäure übersättigt. Die neue Säure fällt ölig aus. Man nimmt mit Äther auf, trocknet die ätherische Lösung mit Natriumsulfat, verdampft den Äther, löst den Rückstand in wenig Chloroform, fällt mit Petroläther und läßt 12 Stunden im Eisschranke stehen. Die abgesaugte kristallinische Masse wird mit Petroläther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 30 g oder 75% der Theorie, berechnet auf Leucin. Das Produkt ist ein Gemisch von zwei Isomeren (es schmilzt bei 105—135°), die man durch fraktionierte Kristallisation aus Wasser trennen kann. Da bei längerem Erhitzen mit Wasser etwas Brom abgespalten wird, so ist es zweckmäßig, besonders beim Arbeiten mit größeren Mengen, den Bromkörper in schon siedendes Wasser einzutragen, ihn schnell durch kräftiges Umschütteln in Lösung zu bringen und sofort abzukühlen. Die Mutterlaugen müssen stets unter geringem Druck eingedampft werden. Durch öfters wiederholte Kristallisation gelingt es, einen schwerer löslichen Körper zu gewinnen, dessen Schmelzpunkt, 147—150° (korr.), sich nicht mehr ändert. Seine Menge beträgt 10% des Rohproduktes. Er mag als α-Brompropionylleucin A von dem Isomeren unterschieden werden. Zur Analyse wurde im Vakuum getrocknet.

0,1987 g gaben 0,1411 AgBr.
0,1426 g „ 6,7 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 18° und 755 mm Druck.

	Berechnet für $C_9H_{16}NO_3Br$	Gefunden
Br	30,05	30,22
N	5,28	5,40

Er löst sich leicht in absolutem Alkohol, Äther, Chloroform, etwas schwerer in heißem Benzol und Toluol. Er ist fast unlöslich in Petroläther. Beim Erhitzen mit Wasser schmilzt er und löst sich in erheblicher Menge. Beim langsamen Erkalten der wässerigen Lösung scheidet er sich in mikroskopischen, langgestreckten Plättchen ab.

α-Brompropionyl-leucin B, Schmelzp. 113—118° (korr.), wurde aus der wässerigen Mutterlauge durch systematische Kristallisation gewonnen. Die Ausbeute war ungefähr die Hälfte des Rohpro-

duktes. Beim weiteren Umkristallisieren änderte sich der Schmelzpunkt nicht mehr. Trotzdem ist für die Einheitlichkeit des Produktes keine sichere Gewähr gegeben. Zur Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,2012 g gaben 0,1412 AgBr.
0,1882 g „ 8,9 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 17° und 746 mm Druck.

	Berechnet für $C_9H_{16}NO_3Br$	Gefunden
Br	30,05	29,86
N	5,28	5,40

Alanyl-leucin A, $CH_3.CH(NH_2).CO.NH.CH(C_4H_9).COOH$.

Das Brompropionylleucin A wird mit der fünffachen Menge wässerigem Ammoniak im geschlossenen Rohre zehn Minuten auf 100° erhitzt, dann rasch auf dem Wasserbade oder unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand mehrmals zur Entfernung des Bromammoniums mit absolutem Alkohol ausgelaugt. Das als kristallinische Masse zurückbleibende Dipeptid ist nahezu rein. Die Ausbeute betrug ungefähr 65% der Theorie. Zur völligen Reinigung wird das Produkt in wenig absolutem Alkohol suspendiert und tropfenweise starkes wässeriges Ammoniak bis zur klaren Lösung hinzugefügt. Erhitzt man dann zum Kochen, so geht das Ammoniak fort und das Dipeptid scheidet sich in mikroskopischen, vierseitigen Tafeln aus. Da die lufttrockne Substanz Wasser enthält, dessen Menge etwas mehr als ein Mol. beträgt, so wurde sie für die Analyse im Toluolbade getrocknet.

0,1377 g verloren 0,0145 g = 10,5%.
0,1512 g getrocknete Substanz gaben 18 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 18° und 767 mm Druck.
0,1574 g gaben 0,3092 CO_2 und 0,1261 H_2O.

	Berechnet für $C_9H_{18}O_3N_2$	Gefunden
C	53,41	53,58
H	8,95	8,96
N	13,89	13,91

Die Verbindung schmeckt schwach bitter und ist in Wasser leicht, in Alkohol außerordentlich schwer löslich. Die wässerige Lösung nimmt beim Erwärmen Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe auf. Beim schnellen Erhitzen im Kapillarrohre schmilzt sie nicht scharf unter Zersetzung gegen 248° (korr.) und verwandelt sich dabei wahrscheinlich in das Anhydrid.

Die Phenylisocyanatverbindung,

$$C_6H_5.NH.CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH.(C_4H_9)COOH,$$

wird in der üblichen Weise gewonnen durch Lösen des Dipeptids in etwas mehr als der für ein Mol. berechneten Menge *n*-Natronlauge und tropfenweisen Zusatz der berechneten Menge Phenylisocyanat zu der auf 0° abgekühlten und kräftig geschüttelten Flüssigkeit. Das Isocyanat verschwindet ziemlich rasch. Zum Schluß wird die alkalische Flüssigkeit filtriert und mit verdünnter Salzsäure übersättigt. Die ausfallende, anfangs klebrige Phenylisocyanatverbindung erstarrt bald kristallinisch. Die Ausbeute betrug 75% der Theorie. Zur Reinigung wird aus heißem Äthylacetat umkristallisiert. Die lufttrockne Substanz verliert beim Erhitzen auf 100° nicht an Gewicht.

0,1306 g gaben 0,2860 CO_2 und 0,0853 H_2O.

0,1569 g „ 17,5 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 18° und 766 mm Druck.

	Berechnet für $C_{16}H_{23}N_3O_4$	Gefunden
C	59,76	59,73
H	7,21	7,31
N	13,11	13,02

Die Substanz schmilzt unter Zersetzung bei 214—218° (korr.). Sie löst sich leicht in Alkohol, etwas schwerer in heißem Essigäther, sehr schwer in Äther und Benzol. Aus heißem Wasser, worin sie ebenfalls schwer löslich ist, fällt sie beim Erkalten in mikroskopischen, langgestreckten, vierseitigen Plättchen aus.

Alanyl-leucin B

wird aus Brompropionylleucin B bereitet. Darstellung und Ausbeute sind die gleichen, wie bei dem Isomeren. Auch in Löslichkeit, Geschmack, Zersetzungspunkt und Wassergehalt der Kristalle ist kaum ein Unterschied. Dagegen haben die Kristalle eine andere Form. Sie fallen aus der mit Ammoniakwasser bereiteten alkoholischen Lösung als mikroskopische, sternförmig gruppierte, kurze Nadeln. Zur Analyse war wegen des Wassergehaltes ebenfalls im Toluolbade getrocknet.

0,1797 g (lufttrocken) verloren 0,0199 g = 11,1%.

0,1531 g getrocknete Substanz gaben 0,3003 CO_2 und 0,1274 H_2O.

0,1572 g gaben 18,7 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 18° und 754 mm Druck.

	Berechnet für $C_9H_{18}O_3N_2$	Gefunden
C	53,41	53,50
H	8,95	9,11
N	13,89	13,66

Die Phenylisocyanatverbindung wird ebenso gewonnen, wie das Derivat des Dipeptids A. Hier sind die Unterschiede etwas größer als bei den Dipeptiden selbst. Denn das aus Äthylacetat umkristallisierte Produkt schmilzt schon bei 185—189° (korr.) und aus heißem Wasser fällt es in mikroskopischen, zu Büscheln vereinigten Nadeln. Ferner verliert die aus Essigäther kristallisierte lufttrockne Substanz bei 100° ungefähr 6% an Gewicht und gibt dann folgende Zahlen:

0,1647 g gaben 0,3608 CO_2 und 0,1065 H_2O.
0,1809 g „ 20,4 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 18° und 754 mm Druck.

	Berechnet für $C_{16}H_{23}N_3O_4$	Gefunden
C	59,76	59,75
H	7,21	7,23
N	13,11	12,95

Die Analyse der lufttrocknen Substanz ergab:

0,1671 g gaben 0,3643 CO_2 und 0,1083 H_2O.
0,1620 g „ 16,8 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 20° und 765 mm Druck.

	Berechnet für $C_{16}H_{23}N_3O_4$	Gefunden
C	59,76	59,46
H	7,21	7,25
N	13,11	11,99

Demnach scheint die Verbindung im lufttrocknen Zustande noch eine flüchtige organische Substanz (Alkohol, Essigäther?) zu enthalten.

Chloracetyl-leucin, $CH_2Cl.CO.NH.CH(C_4H_9).COOH$.

2 g Leucin (synthetisch) in 15,3 ccm *n*-Natronlauge (1 Mol.) gelöst, dazu 3,4 g Chloracetylchlorid (2 Mol.) und 54 ccm *n*-Natronlauge (3,5 Mol.).

Zum Schlusse wird die Flüssigkeit mit 6 ccm fünffach *n*-Salzsäure übersättigt. Das ausfallende Öl erstarrt bald kristallinisch. Es wird nach 12-stündigem Stehen im Eisschranke abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Ausbeute 75% der Theorie. Zur Reinigung wird aus heißem Wasser umkristallisiert, wobei längeres Kochen zu vermeiden ist. Zur Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,1153 g gaben 0,0805 AgCl.
0,1180 g „ 6,8 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 15° und 756 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{14}NO_3Cl$	Gefunden
Cl	17,07	17,26
N	6,76	6,72

Die Verbindung löst sich leicht in Alkohol und Äther, ziemlich schwer in Benzol und fast gar nicht in Petroläther. Aus warmem Wasser kristallisiert sie in rhombenähnlichen, ziemlich dicken Tafeln, die bei 142° (korr.) schmelzen.

Glycyl-leucin, $NH_2.CH_2.CO.NH.CH(C_4H_9).COOH$.

Chloracetylleucin wird mit der fünffachen Menge wässerigem Ammoniak (25%) im Rohre 20 Minuten auf 100° erhitzt, dann die Lösung in einer Schale zur Trockne verdampft und zur Entfernung des Chlorammoniums sorgfältig mit 90-prozentigem Alkohol ausgelaugt. Die Menge des zurückbleibenden Dipeptids betrug 60% der Theorie. Zur Reinigung löst man in wenig warmem Wasser, fügt das mehrfache Volumen Alkohol hinzu und läßt 24 Stunden im Eisschranke stehen. Zur Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,1007 g gaben 0,1878 CO_2 und 0,0752 H_2O.
0,1741 g „ 22,2 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 17° und 760 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{16}O_3N_2$	Gefunden
C	51,0	50,86
H	8,57	8,35
N	14,92	14,83

Das Dipeptid scheidet sich aus verdünntem Alkohol beim langsamen Kristallisieren in mikroskopischen Plättchen ab, die meist vierseitig, öfters aber auch wetzsteinförmig zugespitzt sind. Es schmeckt schwach bitter. Es löst sich leicht in Wasser, fast gar nicht in absolutem Alkohol. Charakteristisch ist das Verhalten gegen Kupfersulfat. Versetzt man die wässerige Lösung mit der Lösung dieses Salzes, so fällt nach kurzer Zeit ein blaßblauer Niederschlag, der aus mikroskopischen, äußerst kleinen Nädelchen besteht und in Wasser, selbt in der Hitze, fast unlöslich ist, dagegen von verdünnter Schwefelsäure und von Natronlauge, von letzterer mit tiefblauer Farbe, gelöst wird. Analysiert wurde diese Kupferverbindung nicht; sie scheint eine Kombination des Dipeptids mit Kupfersulfat zu sein; denn Kupfernitratlösung gibt die Reaktion nicht. Beim Erhitzen im Kapillarrohre schmilzt das Dipeptid unter Braunfärbung und Aufschäumen gegen 242° (korr.) und verwandelt sich in das Anhydrid. Will man dieses in größerer Menge darstellen, so erhitzt man das Dipeptid in einem Bade, bis es schmilzt, und hält zehn Minuten bei dieser Temperatur. Die erkaltete dunkelbraune Schmelze wird dann aus heißem Alkohol unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert. Das reine Produkt schmilzt bei 245°

(korr.) und zeigt alle Eigenschaften des von Brunner[1]) aus Leucylglycin und von E. Fischer[2]) aus Leucylglycinester dargestellten und als Leucylglycinanhydrid bezeichneten Produktes.

0,1919 g gaben 26,6 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 14° und 765 mm Druck.

	Berechnet	Gefunden
N	16,49	16,44

α-Bromisocapronyl-alanin, $(C_4H_9)CHBr.CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

Obschon bei der Einwirkung von α-Bromisocapronylchlorid auf die alkalische Lösung des Alanins nach der Theorie ebenfalls zwei Isomere entstehen könnten, so ist bisher doch nur ein Produkt isoliert worden und zwar in einer Ausbeute von 87%. Der Schmelzpunkt des Rohproduktes liegt schon bei 119—121° (korr.). Zu seiner Darstellung werden 20 g Alanin (inaktiv) in 225 ccm *n*-Alkali gelöst und dann in der üblichen Weise 57 g α-Bromisocapronylchlorid (1,2 Mol.) und 500 ccm *n*-Alkali zugegeben. Beim Übersättigen mit Salzsäure, wozu 75 ccm fünffach *n*-Säure genügen, fällt das Bromisocapronylalanin, vermischt mit etwas Bromcapronsäure, als Öl aus. Es wird ausgeäthert, die ätherische Lösung mit Natriumsulfat getrocknet, dann stark eingeengt und mit viel Petroläther gefällt. Das ausgeschiedene Öl erstarrt bald kristallinisch. Nach mehrstündigem Stehen im Eisschranke wird filtriert und mit Petroläther gewaschen, bis der Geruch der Bromcapronsäure verschwunden ist. Zur Analyse war zweimal aus Benzol umkristallisiert und im Vakuum getrocknet.

0,2073 g gaben 0,1459 AgBr.
0,1763 g „ 7,7 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 17,5° und 743 mm Druck.

	Berechnet für $C_9H_{16}NO_3Br$	Gefunden
Br	30,05	29,95
N	5,28	4,98

Die reine Verbindung hat, wie die Mehrzahl dieser Körper, keinen scharfen Schmelzpunkt. Er liegt bei 123—126° und ändert sich nicht mehr bei weiterem Umkristallisieren. In kaltem Wasser ist sie schwer löslich. Kocht man sie mit Wasser, so schmilzt sie, löst sich in reichlicher Menge und kristallisiert beim Erkalten in sehr feinen, farblosen Blättchen. Sie löst sich ferner leicht in Alkohol, etwas schwerer in Äther, noch schwerer in Benzol und Toluol.

---

[1]) *S. 481.*

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 618 [1905]. (*S. 435.*)

Leucyl-alanin, $(C_4H_9).CH(NH_2).CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

Die Verwandlung des Bromkörpers in das Dipeptid verläuft auffallenderweise wenig glatt. Die Ausbeute betrug nur 33% der Theorie, während das so nahe verwandte Leucylglycin mit 80% Ausbeute entsteht. Dabei ist es einerlei, ob die Einwirkung des Ammoniaks in der Wärme oder in der Kälte stattfindet.

Werden 10 g Bromisocapronylalanin mit 50 ccm Ammoniakwasser von 25% eine Stunde im geschlossenen Rohre auf 100° erhitzt, so ist alles Brom abgespalten. Beim Verdampfen der Lösung bleibt ein kristallinischer Rückstand. Er wurde nochmals mit Alkohol abgedampft, um das Ammoniak zu entfernen und dann mit absolutem Alkohol ausgekocht, wobei neben Bromammonium verschiedene organische Produkte in Lösung gehen, während das Dipeptid zurückbleibt. Die Ausbeute an diesem Produkte beträgt 2,5 g. Zur Reinigung löst man entweder in heißem Wasser und dampft ein, oder man suspendiert in Alkohol, fügt tropfenweise wässeriges Ammoniak bis zur klaren Lösung hinzu und kocht zur Entfernung des Ammoniaks, wobei das Peptid wieder ausfällt. Für die Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,1349 g gaben 0,2642 CO_2 und 0,1072 H_2O.

	Berechnet für $C_9H_{18}O_3N_2$	Gefunden
C	53,41	53,41
H	8,97	8,89

0,1101 g gaben 13 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 13° und 758 mm Druck.

	Berechnet	Gefunden
N	13,89	13,93

Beim schnellen Erhitzen im Kapillarrohre schmilzt die Substanz unter Aufschäumen und Gelbfärbung gegen 248° (korr.) und verwandelt sich dabei in das später beschriebene Anhydrid. Sie ist geschmacklos, im Gegensatze zu den beiden bitterschmeckenden Alanylleucinen. Bei gewöhnlicher Temperatur wird sie von ca. 60 Teilen Wasser gelöst; in heißem Wasser ist sie nicht viel leichter löslich. Sie kristallisiert daraus in Formen, die unter dem Mikroskope meist als schmale, häufig sechsseitige Platten erscheinen. Ähnlich dem Leucin wird sie von Wasser schwer benetzt. Sie ist unlöslich in absolutem Alkohol, Äther, Benzol. Die wässerige Lösung färbt blaues Lakmuspapier schwach rot und löst Kupferoxyd beim Kochen mit tiefblauer Farbe.

Wie die geringe Ausbeute an Leucylalanin schon anzeigt, entstehen bei seiner Darstellung in erheblicher Menge Nebenprodukte. Diese bleiben bei der Reinigung des Dipeptids in den alkoholischen Mutterlaugen. Werden diese verdampft und der Rückstand mit kaltem

Wasser aufgenommen, so bleibt in geringer Menge, ca. 0,6 g, ein Körper zurück, der die Eigenschaften des später beschriebenen Leucylalanin-anhydrids hat. Ein anderes Produkt läßt sich der angesäuerten wässerigen Mutterlauge mit Äther entziehen. Es bleibt beim Verdampfen des Äthers als zähes Öl zurück. Seine Menge betrug ca. 1,4 g. Es reagiert stark sauer. Seine Lösung in überschüssigem Natriumcarbonat entfärbt Kaliumpermanganat momentan. Bei mehrstündigem Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure auf 100° entsteht eine ölige und flüchtige Säure, die im Geruch große Ähnlichkeit mit der α-Isohexensäure hat. Es scheint demnach, daß obiges Produkt das Isohexenoylalanin ist, das aus dem Bromcapronylderivat durch Abspaltung von Bromwasserstoff entstehen kann. In der ausgeätherten wässerigen Lösung ist noch etwas Dipeptid und etwas Anhydrid enthalten, die man nach Entfernung des Bromammoniums durch Silbersulfat und Baryumcarbonat isolieren kann. Die Menge des ersten betrug 0,6 g, so daß sich die Gesamtausbeute an Dipeptid auf 3,1 g oder 40% der Theorie steigert. Von dem Anhydrid wurden noch 0,3 g gewonnen. Von diesem Produkte wurde eine Stickstoffbestimmung ausgeführt.

0,1313 g gaben 17 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 17° und 749 mm Druck.

	Berechnet	Gefunden
N	15,22	14,84

In den Mutterlaugen blieb schließlich noch in ziemlich erheblicher Menge ein in Alkohol leicht löslicher und nicht kristallisierender Körper, dessen Zusammensetzung noch nicht festgestellt ist.

Carbäthoxyl-leucyl-alanin,

$(COOC_2H_5).NH.CH(C_4H_9).CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

2 g Dipeptid werden in 10 ccm *n*-Natronlauge gelöst, mit Eis gekühlt und nach Zusatz von 1,3 g Chlorkohlensäureester (1,2 Mol.) tüchtig geschüttelt. Nach zehn Minuten fügt man weitere 11 ccm *n*-Natronlauge oder 0,6 g Natriumcarbonat hinzu und schüttelt, bis der ölige Chlorkohlensäureester verschwunden ist. Beim Übersättigen mit Salzsäure fällt die neue Verbindung als Öl aus und erstarrt bei gutem Abkühlen nach kurzer Zeit kristallinisch. Nach dem Absaugen und Waschen mit kaltem Wasser ist das Produkt nahezu rein. Ausbeute 2,3 g oder 85% der Theorie. Zur Analyse war aus heißem Wasser umkristallisiert und im Vakuum getrocknet.

0,1681 g gaben 0,3231 CO_2 und 0,1200 H_2O.
0,1843 g „ 15,8 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 13° und 766 mm Druck.

	Berechnet für $C_{12}H_{22}O_5N_2$	Gefunden
C	52,51	52,42
H	8,08	7,99
N	10,24	10,22

Die Verbindung schmilzt bei 166—168° (korr.). Sie löst sich leicht in Alkohol, schwerer in heißem Essigäther und heißem Wasser; und sukzessive dann schwerer in Chloroform, Äther, Petroläther. Aus heißem Wasser kristallisiert sie beim schnellen Abkühlen in mikroskopischen, schiefen, meist vierseitigen Tafeln.

Leucyl-alanin-anhydrid,

$$\begin{array}{l} C_4H_9.CHNHCO \\ \quad\;\; | \qquad\quad | \\ \quad\;\; CONHCH.CH_3 \end{array}$$

(Methylisobutyldiketopiperazin).

Wie schon erwähnt, geht das Dipeptid beim Schmelzen in das Anhydrid über. Erhitzt man 1 g in einem Bade auf ca. 250°, so ist die Gasentwickelung in 1/4 Stunde beendigt und eine hellbraune Flüssigkeit neben einem geringen Sublimat entstanden. Die erkaltete Schmelze wird aus heißem Alkohol umkristallisiert. Ausbeute nach dem Umkristallisieren 0,75 g oder 82% der Theorie. Zur Analyse war nochmals aus heißem Alkohol umkristallisiert und im Vakuum getrocknet.

0,1887 g gaben 0,4046 CO_2 und 0,1472 H_2O.

0,1726 g „ 22,1 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 14° und 764 mm Druck.

	Berechnet für $C_9H_{16}N_2O_2$	Gefunden
C	58,63	58,48
H	8,75	8,73
N	15,25	15,17

Die Substanz schmilzt bei 247° (korr.). Zum Unterschiede von dem Dipeptid ist sie in Wasser selbst in der Hitze ziemlich schwer, dagegen in heißem Alkohol leicht löslich. Ferner färbt sich die wässerige Lösung beim kurzen Kochen mit Kupferoxyd nicht blau. Sie schmeckt stark bitter. In heißem Chloroform ist sie ziemlich leicht und dann successive schwerer löslich in Benzol, Äther, Petroläther. Aus der heißen alkoholischen Lösung kristallisiert sie in mikroskopischen, meist garbenförmig vereinigten, biegsamen Nadeln.

Chloracetyl-leucyl-alanin,

$CH_2Cl.CO.NH.CH(C_4H_9).CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

4 g Leucylalanin, gelöst in 20 ccm *n*-Natronlauge; dazu 4,5 g Chloracetylchlorid (2 Mol.) und 70 ccm *n*-Natronlauge in der üblichen Weise. Schließlich wird mit 10 ccm fünffach *n*-Salzsäure übersättigt. Die

Lösung bleibt zunächst klar, scheidet aber beim 12-stündigen Stehen im Eisschranke den allergrößten Teil des Chloracetylleucylalanins ab. Die Ausbeute betrug 4,5 g oder 82% der Theorie, berechnet auf das Dipeptid. Der große Überschuß an Säurechlorid ist auch hier aus den oben besprochenen Gründen zweckmäßig. Zur Reinigung wird aus heißem Wasser umkristallisiert, wobei langes Kochen zu vermeiden ist. Für die Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,1845 g gaben 0,0968 AgCl.
0,1856 g ,, 16,1 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 18° und 762 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{19}O_4N_2Cl$	Gefunden
Cl	12,72	12,97
N	10,08	10,06

Die Substanz schmilzt nicht ganz scharf, von 158—161° (korr.). Sie löst sich leicht in heißem Wasser und kaltem Alkohol, bedeutend schwerer in Benzol, und im kristallinischen Zustande in Äther schwer. Trotzdem läßt sie sich aus der wässerigen Lösung verhältnismäßig leicht ausäthern.

Glycyl-leucyl-alanin,

$NH_2.CH_2.CO.NH.CH(C_4H_9).CO.NH.CH(CH_3)COOH.$

Die vorhergehende Chlorverbindung wird mit der fünffachen Menge wässerigem 25-prozentigen Ammoniak etwa $^1/_2$ Stunde auf 100° erwärmt und die Flüssigkeit zur Trockne verdampft. Entfernt man aus dem Rückstande das Chlorammonium durch Auslaugen mit verdünntem Alkohol, so bleibt fast reines Tripeptid zurück. Ausbeute 70% der Theorie. Zur Reinigung löst man in wenig Wasser, versetzt mit viel Alkohol und läßt die bald trübe werdende Flüssigkeit 24 Stunden stehen, wobei die Hauptmenge des Tripeptids ausfällt. Für die Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,1768 g gaben 0,3304 CO_2 und 0,1296 H_2O.
0,1800 g ,, 24,9 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 18° und 757 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{21}O_4N_3$	Gefunden
C	50,91	50,97
H	8,16	8,20
N	16,24	15,95

Die Substanz zersetzt sich im Kapillarrohre gegen 250° (korr.) unter Bräunung und Aufschäumen. Sie ist in Wasser leicht löslich und scheidet sich beim Eindampfen der wässerigen Lösung in mikroskopischen, meist vierseitigen, schiefen Plättchen ab. Sie schmeckt

schwach bitter. Die wässerige Lösung rötet schwach blaues Lakmuspapier und gibt mit Alkali und wenig Kupfersalz eine ins Rötliche spielende Violettfärbung.

Aktives Alanyl-glycin (*l*-Verbindung), $NH_2CH(CH_3).CO.NH.CH_2COOH$.

Das Peptid wurde ebenso wie das zuvor beschriebene inaktive Alanylglycin (Axhausen) mit Hilfe der *l*-Brompropionsäure gewonnen. Die Bereitung der letzteren und ihres Chlorids ist in der nachfolgenden Abhandlung beschrieben. Zur Kombination mit dem Glykocoll wurde wegen des hohen Preises der aktiven Brompropionsäure die Methode gewählt, die die besten Ausbeuten gibt, d. h. Kombination mit dem Ester. Die Reaktion verläuft genau so wie beim inaktiven Chlorid. Das Produkt, der *l*-Brompropionylglycinester, schmilzt von 50—52°, also nur einige Grade niedriger als der inaktive Körper. Dagegen schmilzt das aus dem Ester durch Verseifen erhaltene *l*-Brompropionylglycin fast 20° höher als das inaktive Produkt. Um Racemisierung zu vermeiden, wurde die Verwandlung des Bromkörpers in das Dipeptid bei gewöhnlicher Temperatur ausgeführt. Zu dem Zwecke wurden 3,6 g *l*-Brompropionylglycin mit 20 ccm wässerigem 25-prozentigen Ammoniak, das vorher stark gekühlt war, übergossen. Die Lösung bleibt dann mehrere Tage bei Zimmertemperatur stehen, bis die Untersuchung einer Probe zeigt, daß alles Brom abgespalten ist. Dann wird unter vermindertem Druck verdampft, der Rückstand mit Alkohol übergossen, wieder verdampft und schließlich zur Entfernung des Bromammoniums mit kaltem absoluten Alkohol sorgfältig ausgelaugt. Die Ausbeute an Dipeptid betrug 2 g oder 80% der Theorie. Zur Reinigung wird in wenig Wasser gelöst und mit dem mehrfachen Volumen absoluten Alkohols versetzt. Dadurch fällt das Dipeptid als sandiger Niederschlag, der unter dem Mikroskop deutlich kristallinisch, häufig in tetraëderähnlichen Formen erscheint. Zur Analyse war im Vakuum getrocknet.

0,1294 g gaben 0,1946 CO_2 und 0,0809 H_2O.

0,1807 g „ 29,4 ccm Stickgas über 33-prozentiger KOH bei 19° und 772 mm Druck.

	Berechnet für $C_5H_{10}N_2O_3$	Gefunden
C	41,04	41,02
H	6,91	6,99
N	19,26	19,07.

Das Dipeptid schmilzt bei raschem Erhitzen im Kapillarrohre unter Gasentwickelung und Bräunung gegen 256° (korr.), also erheblich höher

als das inaktive Produkt, und geht dabei höchst wahrscheinlich in das Anhydrid über. Es ist fast geschmacklos, löst sich sehr leicht in Wasser, dagegen sehr schwer in den gebräuchlichen organischen Solventien. In wässeriger Lösung dreht es das polarisierte Licht recht stark nach links. Eine Lösung vom Gesamtgewicht 3,9804 g, die 0,3813 g Dipeptid enthielt und das spez. Gew. 1,0368 hatte, dreht bei 20° im 1-Dezimeterrohre Natriumlicht 4,83° nach links. Mithin $[\alpha]_D^{20} = - 48{,}6^0$.

Die geringe Menge an Material hat eine Wiederholung des ganzen Versuches verhindert. Es ist deshalb keine Gewähr vorhanden, daß das aktive Dipeptid ganz rein, d. h. völlig frei von Racemkörper war; daß aber die Menge des letzteren nicht groß gewesen sein kann, beweist die optische Untersuchung der hydrolytischen Spaltprodukte.

Durch mehrstündiges Erhitzen mit starker Salzsäure auf 100° werden bekanntlich alle Polypeptide bis zu den Aminosäuren hydrolysiert. Dieser Versuch konnte für das vorliegende Dipeptid direkt mit der optischen Bestimmung kombiniert werden. 0,4903 g *l*-Alanylglycin wurden mit 5 ccm Salzsäure von 20% im geschlossenen Rohre 3 Stunden auf 100° erhitzt. Nach 17-stündigem Aufbewahren der Lösung bei gewöhnlicher Temperatur drehte sie bei 20° Natriumlicht im 1-Dezimeterrohre 0,78° nach links. Zum Vergleich wurden die dem Peptid entsprechenden Mengen von reinem *d*-Alanin (0,299 g) und Glykocoll (0,252 g) ebenfalls in 5 ccm 20-prozentiger Salzsäure gelöst. Diese Flüssigkeit drehte im 1-Dezimeterrohre bei 20° Natriumlicht 0,82° nach rechts. Selbst wenn man die kleine Konzentrationsänderung in Betracht zieht, die bei der Hydrolyse des Dipeptids durch den Verbrauch von einem Mol. Wasser entsteht, so beträgt der Unterschied in der Drehung der beiden Lösungen nur 6%.

Allerdings sind bei den geringen Werten die Beobachtungsfehler nicht klein. Aber auch wenn sie berücksichtigt werden, so dürfte doch der Unterschied kaum über 10% hinausgehen. Bedenkt man endlich, daß bei der Hydrolyse der Polypeptide mit heißer Salzsäure immer ein kleiner Teil der Aminosäuren racemisiert wird, so kann man sagen, daß nach dem vorliegenden Versuche das untersuchte *l*-Alanylglycin auch in optischer Beziehung ein ziemlich einheitliches Material gewesen ist.

4. Optisch aktive α-Brompropionsäure
von Otto Warburg.

Der Ester der aktiven Brompropionsäure ist bereits von Purdie und Walker[1]) aus dem aktiven Milchsäureester mit Phosphorpentabromid gewonnen werden. Aber das Verfahren ist für die Darstellung

[1]) Journ. chem. Soc. 67, 914.

großer Mengen von aktiver Brompropionsäure viel zu unbequem. Einfacher ist die Methode von Ramberg[1]), der die inaktive Brompropionsäure durch das Cinchoninsalz zerlegte. Er gelangte aber nur zu einem Produkte mit der spezifischen Drehung —7,55°, das, wie sich später zeigen wird, zum größten Teil noch aus inaktiver Säure bestand.

Die Zerlegung der Brompropionsäure läßt sich nicht allein mit Cinchonin in wässeriger Lösung, sondern auch mit Strychnin und Brucin in alkoholischer Lösung ausführen. Und zwar kristallisiert aus Alkohol beim Brucin zuerst das Salz der Rechtssäure und beim Strychnin das Salz der Linkssäure. Da aber die Verwendung dieser beiden Alkaloïde keinen Vorteil bietet, so wurde die Cinchoninmethode von Ramberg benutzt und verbessert. Das nach Rambergs Angabe dargestellte Cinchoninsalz enthält ungefähr 65% Links- und 35% Rechtssäure. Um letztere zu entfernen, ist sehr häufiges Umkristallisieren nötig. Dies wird erschwert durch die Zersetzlichkeit der Brompropionsäure, die in Form ihrer Salze Bromwasserstoff abgibt, wenn die Temperatur der wässerigen Lösung 50—60° übersteigt. Man muß deshalb das Cinchoninsalz bei niederer Temperatur (30—50°) in Wasser lösen und die Flüssigkeit durch Verdampfen unter stark vermindertem Druck einengen. Dem entspricht folgende Vorschrift zur Darstellung der

l-Brompropionsäure.

200 g inaktive käufliche Brompropionsäure werden zunächst nach Rambergs Vorschrift in 5 L Wasser von 45° gelöst und unter tüchtigem Schütteln 200 g gepulvertes Cinchonin in kleinen Portionen zugegeben. Statt diese Flüssigkeit nach Ramberg verdunsten zu lassen, ist es bequemer, sie unter stark vermindertem Druck aus einem Bade, dessen Temperatur zwischen 40° und 50° liegt, auf die Hälfte einzudampfen. Dabei scheidet sich ein erheblicher Teil des Cinchoninsalzes kristallinisch ab. Nach dem völligen Erkalten wird das Salz filtriert. Seine Menge beträgt 190—200 g. Falls das Salz sich ölig abscheidet, ist es ratsam, einige Kristalle einzuimpfen, die man sich durch Verdunsten einer kleinen Menge der Lösung bei gewöhnlicher Temperatur ziemlich rasch verschaffen kann. Das so gewonnene Cinchoninsalz wird nun gepulvert, in Wasser von 40° durch Schütteln gelöst und diese Flüssigkeit abermals unter vermindertem Druck eingeengt, bis der größte Teil ausgeschieden ist, ca. 170 g. Diese Art der Kristallisation muß nun sehr häufig (15—20mal) wiederholt werden. Zur Isolierung der freien Säure löst man das Salz in überschüssiger verdünnter Salzsäure, äthert

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 3354 [1900].

die Brompropionsäure aus, trocknet den Äther mit Natriumsulfat, verdampft und fraktioniert den öligen Rückstand unter sehr geringem Druck. Bei 0,2—0,4 mm destilliert die Säure aus einem Bade, dessen Temperatur 70—80° beträgt, völlig über. Auf diese Art wurde eine Säure gewonnen, die bei 20° Natriumlicht 45,64° nach links drehte und das spez. Gew. 1,7084 hatte. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20}$ —26,7°. Die Analyse desselben Präparates ergab:

0,2035 g gaben 0,2509 AgBr.

	Berechnet für $C_3H_5O_2Br$	Gefunden
Br	52,26	52,47

Die Ausbeute an diesem Produkte beträgt ungefähr 5% der inaktiven Säure, also 10% der Theorie. Ob die Säure ganz rein gewesen ist, läßt sich schwer sagen. Es verdient aber bemerkt zu werden, daß das Cinchoninsalz, nachdem seine Säure bereits den Drehungswinkel —42° im 1-Dezimeterrohre erreicht hatte, noch fünfmal umkristallisiert war.

Durch Ammoniak wird die Säure leicht in Alanin verwandelt und zwar entsteht dabei das *l*-Alanin. Obschon man mit Rücksicht auf die Versuche von Walden daraus nicht schließen kann, daß beide Verbindungen die gleiche Konfiguration haben, so läßt sich doch die Reaktion bis zu einem gewissen Grade benutzen, um den etwaigen Gehalt an inaktiver Säure zu ermitteln.

Verwandlung der *l*-Brompropionsäure in *l*-Alanin. Die Säure wurde in einer Kältemischung mit der fünffachen Menge gleichfalls gekühlten, wässerigen Ammoniaks von 25% übergossen und die Lösung zuerst mehrere Stunden bei 0° und dann einige Tage bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt, bis die Untersuchung einer Probe zeigte, daß alles Brom abgespalten war. Dann wurde die Flüssigkeit in einer Schale verdampft, nach Zusatz von Alkohol nochmals verdampft und schließlich der Rückstand zur Entfernung des Bromammoniums mit kaltem absoluten Alkohol sorgfältig ausgelaugt, dann in wenig Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. 3 g Brompropionsäure lieferten so 1,1 g oder 65% der Theorie an reinem Alanin. Zur optischen Untersuchung wurden 0,3684 g in etwas mehr als der berechneten Menge *n*-Salzsäure gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 5,4838 g, spez. Gew. 1,034, Drehung im 1-Dezimeterrohre bei 20° und Natriumlicht —0,88°. Mithin $[\alpha]_D^{20}$ —9°.

Da die spezifische Drehung des reinen Alanins —9,68° (vgl. *S. 561*) beträgt, so ergibt sich für das vorliegende Präparat ein Gehalt von ungefähr 7% an inaktivem Produkt. Da aber wahrscheinlich bei der Umwandlung des Bromkörpers in die Aminosäure eine geringe Racemisierung

eintritt, da es ferner nicht wahrscheinlich ist, daß bei der Isolierung des aktiven Alanins eine Entfernung des Racemkörpers stattgefunden hat, so folgt daraus, daß die angewandte *l*-Brompropionsäure schon recht rein gewesen sein muß.

l-Brompropionylchlorid.

Dieses für die Synthese von aktiven Polypeptiden bestimmte Chlorid wurde aus der hochdrehenden Brompropionsäure nicht mit Chlorphosphor, wegen der schwierigen Abtrennung des Phosphoroxychlorids, sondern mit Thionylchlorid dargestellt. In der Kälte wirkt dieses nicht ein. Erwärmt man aber mit etwas mehr als der berechneten Menge am Rückflußkühler auf 55—65°, so geht die Reaktion ohne Schwierigkeit vonstatten und nach einigen Stunden fraktioniert man unter vermindertem Druck. Bei 12 mm Druck ging das *l*-Brompropionylchlorid bei 27° (Thermometer ganz im Dampf) über.

Gewinnung der *l*-Brompropionsäure aus *d*-Alanin.

Bekanntlich werden aliphatische Aminoverbindungen durch Nitrosylbromid in die entsprechenden Bromderivate verwandelt und die Reaktion läßt sich nach P. Walden auch in wässeriger Lösung durchführen, ohne daß bei optisch-aktiven Körpern die Aktivität verschwindet. Diese Erfahrung hat sich auch beim aktiven Alanin bestätigt und seine Verwandlung in die aktive Brompropionsäure geht so leicht vonstatten, daß man sie für deren Gewinnung benutzen kann. 5 g *d*-Alanin werden entsprechend der allgemeinen Vorschrift von Walden, mit einem Gemisch von 5,5 g konzentrierter Schwefelsäure und 15 ccm Wasser übergossen und dazu unter Kühlung 7,5 g Bromkali und 12 g Brom gegeben. In das mit Eis gekühlte Gemisch leitet man drei Stunden einen kräftigen Strom von Stickoxyd, gibt dann wieder 4 g Brom zu und setzt das Einleiten des Gases noch zwei Stunden fort. Um die Hauptmenge des überschüssigen Broms zu entfernen, wurde einige Zeit Luft durch die Lösung geblasen, der Rest durch Schütteln mit Quecksilber gebunden, dann die Brompropionsäure mit Äther ausgeschüttelt, die mit Natriumsulfat getrocknete ätherische Lösung verdunstet und der Rückstand unter geringem Druck destilliert. Die Menge der Säure betrug 5,5 g oder 64% der Theorie. Sie drehte bei 20° im 1-Dezimeterrohre 39° nach links, so daß sie im Vergleich zu der oben beschriebenen *l*-Brompropionsäure ungefähr 15% inaktives Produkt enthielt. Bei der Behandlung mit wässerigem Ammoniak gab die Säure, wie vorher gezeigt, das *l*-Alanin. Man sieht daraus, daß hier ein ähnlicher Über-

gang von *d*- zu *l*-Alanin stattfindet, wie ihn Walden[1]) bei der Asparaginsäure und der Äpfelsäure ausführlich studiert hat.

Vielleicht ist diese weniger reine *l*-Brompropionsäure auch zur Darstellung aktiver Polypeptide des Alanins geeignet.

5. Über Leucyl-isoserin

von Wilhelm F. Koelker.

Als Ausgangsmaterial diente Isoserin, das nach der Vorschrift von E. Fischer und H. Leuchs[2]) dargestellt war. Die Kombination mit α-Bromisocapronylchlorid geschah in der gewöhnlichen Weise.

α-Bromisocapronyl-isoserin,

$C_4H_9 . CHBr . CO . NHCH_2 . CH(OH)CO_2H$.

10 g Isoserin werden in 96 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst und unter Kühlung mit einer Eiskochsalzmischung in kleinen Portionen abwechselnd mit 24,3 g (1,2 Mol.) α-Bromisocapronylchlorid und 144 ccm (1,5 Mol.) *n*-Natronlauge versetzt und jedesmal kräftig geschüttelt, bis der Geruch nach Säurechlorid verschwunden ist. Die Operation soll etwa 30 Minuten dauern. Die alkalische Lösung wird dann durch 29 ccm fünffach *n*-Salzsäure angesäuert und der teilweise ausfallende ölige Bromkörper wiederholt ausgeäthert. Beim Verdampfen des Äthers bleibt ein Öl, das bald zum größten Teile kristallisiert. Durch Anrühren mit Petroläther, der die beigemengte Bromcapronsäure leicht löst, wird die Kristallisation vervollständigt. Die Ausbeute betrug 25 g oder 91% der Theorie.

Zur Analyse wurde die Substanz mehrmals aus der fünffachen Menge heißem Wasser umkristallisiert, wobei der Schmelzpunkt 135 bis 138° (korr. 136—139°) konstant blieb, und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

0,1668 g gaben 0,2362 CO_2 und 0,0864 H_2O.
0,1865 g ,, 8,0 ccm Stickgas bei 18° und 760 mm Druck.
0,2147 g ,, 0,1424 AgBr.

	Berechnet für $C_9H_{16}O_4NBr$ (Molgew. 283)	Gefunden
C	38,27	38,61
H	5,67	5,76
N	4,97	4,95
Br	28,36	28,27

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **28**, 2766; **29**, 133; **30**, 2795, 3146.
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3794 [1902]. (*S. 255.*)

Die Substanz kristallisiert aus Wasser in schönen, glänzenden Tafeln, die sechsseitig sind, zuweilen jedoch an zwei gegenüberliegenden Ecken eine Abschrägung haben und dann achtseitig erscheinen. Sie ist leicht löslich in heißem Wasser, Alkohol, Aceton und Essigäther, viel schwerer löslich in kaltem Wasser, heißem Benzol und heißem Chloroform. In Äther ist die kristallisierte Substanz viel schwerer löslich, als das ölige Rohprodukt. Trotz des einheitlichen Aussehens ist das Präparat aller Wahrscheinlichkeit nach ein Gemisch, da es bei der Behandlung mit Ammoniak zwei Dipeptide liefert.

Leucyl-isoserin, $C_4H_9.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CH(OH).CO_2H$.

Bei Einwirkung von Ammoniak verliert der vorhergehende Bromkörper ziemlich leicht das Halogen. Löst man ihn in der fünffachen Menge wässerigen Ammoniaks von 25% und läßt ihn entweder drei bis vier Tage bei gewöhnlicher Temperatur stehen oder erhitzt im geschlossenen Rohre eine Stunde auf 100°, so ist die Abspaltung des Broms nahezu vollständig. Auch für die Ausbeute an Dipeptid ist es gleichgültig, ob man in der Kälte oder in der Wärme arbeitet. Zu seiner Isolierung wird die ammoniakalische Lösung auf dem Wasserbade, zuletzt unter Zusatz von etwas Alkohol verdampft, dann nochmals in Wasser gelöst und zur möglichst vollständigen Entfernung des freien Ammoniaks wieder verdampft. Zur Beseitigung des Bromammons löst man dann in wenig heißem Wasser und fällt mit dem vierfachen Volumen absoluten Alkohols. Wenn nötig, wird diese Operation wiederholt. Die Ausbeute an halogenfreiem Dipeptid betrug ungefähr 80% der Theorie. Das Produkt ist ein Gemisch von zwei Isomeren, die sich durch Wasser trennen lassen.

Leucyl-isoserin A.

Diese schwerer lösliche Form bleibt zurück, wenn das Rohprodukt mit der dreifachen Menge Wasser bei gewöhnlicher Temperatur durchgerührt und nach etwa 10 Minuten filtriert wird. Seine Menge betrug etwa die Hälfte des Rohproduktes. Zur völligen Reinigung wird es aus der vierfachen Menge heißem Wasser umkristallisiert. Beim Erkalten scheidet es sich in mikroskopischen Tafeln aus, die wie Rhomben aussehen. Sie enthalten ein Mol. Kristallwasser, das bei 100° entweicht.

I. 0,2205 g verloren 0,0169 g.
II. 0,2058 g „ 0,0158 g.
III. 0,4142 g „ 0,0316 g.

Berechnet für		Gefunden		
$C_9H_{18}O_4N_2 + H_2O$ (Molgew. 236)		I.	II.	III.
1 Mol. H_2O	7,63	7,62	7,68	7,63

Die bei 100° getrocknete Substanz verlor bei 140° nicht mehr an Gewicht und gab folgende Zahlen:

0,1701 g gaben 0,3091 CO_2 und 0,1182 H_2O.
0,1959 g „ 22,1 ccm Stickgas bei 19° und 760 mm Druck.

	Berechnet für $C_9H_{18}O_4N_2$ (Molgew. 218)	Gefunden
C	49,54	49,56
H	8,26	8,49
N	12,85	12,99

Das trockne Dipeptid zersetzt sich beim raschen Erhitzen im Kapillarrohre gegen 228° unter Aufschäumen, nachdem schon vorher Bräunung eingetreten ist. Es ist fast geschmacklos, und seine wässerige Lösung reagiert auf blaues Lakmus ganz schwach sauer. Von Phosphorwolframsäure wird es in 10-prozentiger Lösung nicht gefällt. Kupferoxyd löst es mit blauer Farbe.

Phenylisocyanatverbindung,

$$C_4H_9.\underset{\displaystyle NH.CO.NH.C_6H_5}{CH}.CO.NH.CH_2.CH(OH).CO_2H\,.$$

2 g Dipeptid wurden in 9 ccm *n*-Natronlauge und 20 ccm Wasser gelöst, zu der gekühlten Lösung 1 g Phenylisocyanat gegeben und kräftig geschüttelt, bis sein Geruch verschwunden war. Beim Übersättigen mit Salzsäure fiel die Phenylcyanatverbindung zum Teil als zähe Masse aus und beim längeren Stehen der wässerigen Lösung schied sich eine weitere, recht erhebliche Menge kritallinisch ab. Die Ausbeute betrug 80% der Theorie. Zur Reinigung wird die Substanz entweder in Essigäther gelöst und mit Petroläther gefällt oder noch besser aus heißem Wasser umkristallisiert. Beim langsamen Kristallisieren bilden sich gewöhnlich kleine Prismen. Für die Analyse war im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,2064 g gaben 0,4310 CO_2 und 0,1260 H_2O.
0,1568 g „ 16,8 ccm Stickgas bei 18° und 751 mm Druck.

	Berechnet für $C_{16}H_{23}O_5N_3$ (Molgew. 337)	Gefunden
C	56,97	56,95
H	6,82	6,85
N	12,47	12,57

Die Verbindung ist in Alkohol, Aceton, Essigäther leicht, in Petroläther fast gar nicht löslich. Sie schmilzt im Kapillarrohre bei 176 bis 177° (korr.).

Leucyl-isoserin B.

Beim Auslaugen des rohen Dipeptids, dessen Menge 7 g betrug, mit der dreifachen Menge kalten Wassers geht diese Form in Lösung und wird durch viel Alkohol daraus gefällt. Die Ausbeute betrug 2,5 g. Zur Reinigung wurde aus sehr wenig heißem Wasser umkristallisiert. Dieses Dipeptid bildet farblose Nadeln, die zum Unterschiede von dem Isomeren kein Kristallwasser haben. Für die Analyse war im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1900 g gaben 0,3452 CO_2 und 0,1420 H_2O.
0,2076 g „ 23,4 ccm Stickgas bei 18° und 756 mm Druck.

	Berechnet für $C_9H_{18}O_4N_2$ (Molgew. 218)	Gefunden
C	49,54	49,56
H	8,26	8,38
N	12,85	12,95

Die Verbindung verhält sich beim Erhitzen ähnlich wie das Isomere, zersetzt sich aber einige Grade höher, gegen 234° (korr.), ebenfalls unter vorheriger Bräunung. In bezug auf Geschmack, Verhalten gegen Phosphorwolframsäure ist sie gleich der Verbindung A. Dagegen zeigt sich ein kleiner Unterschied bei der Phenylisocyanatverbindung. Diese wurde genau so hergestellt wie das Isomere, für die Analyse aus heißem Wasser umkristallisiert und über Schwefelsäure getrocknet.

0,1378 g gaben 0,2871 CO_2 und 0,0820 H_2O.
0,1190 g „ 12,9 ccm Stickgas bei 18° und 752 mm Druck.

	Berechnet für $C_{16}H_{23}O_5N_3$ (Molgew. 337)	Gefunden
C	56,97	56,82
H	6,82	6,68
N	12,47	12,40

Aus heißem Wasser fällt sie in vierseitigen Prismen aus, die domaähnlich an einem Ende abgestumpft sind. Sie schmilzt bei 192—193° (korr.), mithin etwa 16° höher als die Verbindung A.

Hydrolyse der beiden Leucyl-isoserine.

Erhitzt man 1 g der Dipeptide mit 10 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19) einige Stunden in einem Kölbchen auf dem Wasserbade und verdampft dann die Lösung, so bleibt ein Rückstand von salzsaurem

Leucin und salzsaurem Isoserin. Zur Gewinnung der freien Aminosäuren wird der Rückstand mit wässerigem Ammoniak übergossen, wieder verdampft und das Chlorammon mit wenig kaltem Wasser ausgelaugt. Um sodann das Leucin und Isoserin zu trennen, kocht man mehrmals mit 50-prozentigem Alkohol aus. Dabei geht Leucin in Lösung und scheidet sich beim Erkalten wieder ab. Die Ausbeute ist sehr gut. Zum sicheren Nachweis, daß es sich um gewöhnliches racemisches Leucin handelt, wurde das Produkt mit Phenlcyanat gekuppelt und die Verbindung durch Salzsäure in das Isobutylphenylhydantoïn[1]) übergeführt. Letzteres zeigte den Schmelzp. 124° und die Zusammensetzung $C_{13}H_{16}O_2N_2$.

A) 0,1840 g gaben 0,4535 CO_2 und 0,1160 H_2O.

	Berechnet für $C_{13}H_{16}O_2N_2$	Gefunden
C	67,24	66,94
H	6,77	6,89

B) 0,1028 g gaben 0,2527 CO_2 und 0,0618 H_2O.

	Berechnet für $C_{13}H_{16}O_2N_2$	Gefunden
C	67,24	67,22
H	6,77	7,07

Da das Resultat bei beiden Dipeptiden genau dasselbe war, so unterliegt es keinem Zweifel, daß sie beide Derivate des gewöhnlichen Leucins sind.

Verhalten der Leucyl-isoserine und verwandter Körper gegen salpetrige Säure.

Wären die beiden Leucylisoserine strukturisomer, so daß das eine die Formel:

$$C_4H_9.CH(NH_2).CO{-}OCH\langle{}^{CH_2NH_2}_{CO_2H} ,$$

das andere die Formel:

$$C_4H_9.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CH(OH).CO_2H$$

hätte, so würden sie sich durch die Anzahl der Aminogruppen unterscheiden, und man dürfte dann eine Verschiedenheit in der Einwirkung der salpetrigen Säure erwarten. Der Versuch hat aber ergeben, daß es nicht der Fall ist. Eine abgewogene Menge Substanz, 0,2—0,3 g, wurde mit 15 ccm Wasser und der für drei Mol. berechneten Menge *n*-Salzsäure

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2393 [1900]. (*S. 169.*)

in einen weithalsigen Rundkolben von etwa 50 ccm Inhalt gebracht, der mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen war. In einer Bohrung befand sich ein Tropftrichter, dessen unteres Rohr umgebogen und zu einer Spitze ausgezogen war und unter die im Kolben befindliche Flüssigkeit tauchte. Durch die beiden anderen Öffnungen des Stopfens gingen ein Gaszuleitungsrohr, das fast bis auf den Boden des Kolbens reichte und mit einem Kohlensäureapparat verbunden war, sowie ein Gasableitungsrohr. Letzteres stand mit zwei hintereinander geschalteten Waschflaschen und einem Eudiometer in Verbindung. Die erste Waschflasche war mit einer kaltgesättigten Lösung von Eisenvitriol, die zweite mit einer durch Soda alkalisch gemachten Permanganatlösung beschickt. Das Eudiometer enthielt 33-prozentige Kalilauge. Nachdem die Luft völlig durch Kohlensäure verdrängt war, ließ man durch den Tropftrichter eine ziemlich konzentrierte Lösung von drei Mol. Natriumnitrit in den Kolben bei gewöhnlicher Temperatur einfließen und spülte mit Wasser nach. Alsbald trat Gasentwickelung ein. Nach $^1/_4$ Stunde war die Hauptreaktion zu Ende. Nun wurde der Kolben auf 60° erwärmt und schließlich so lange Kohlensäure durch den Apparat geleitet, bis die Gasblasen im Eudiometer gänzlich absorbiert wurden. Da das Gas immer noch Stickoxyd enthielt, so wurde es nach einstündigem Stehen über Kalilauge in ein anderes Eudiometer übergeführt, das mit Eisenvitriollösung gefüllt war und hier nach zwölfstündigem Stehen das Volumen des Stickstoffes abgelesen.

Leucyl-isoserin A.

0,2423 g gaben 36,0 ccm Stickgas bei 13° und 762 mm Druck.
0,2462 g „ 36,6 ccm Stickgas „ 13° „ 762 mm Druck.

	Berechnet für	Gefunden
$2\,N_2$	25,70	17,60
$1\,N_2$	12,85	17,47

Leucyl-isoserin B.

0,2509 g gaben 36,5 ccm Stickgas bei 13° und 765 mm Druck.
0,2456 g „ 35,4 ccm Stickgas „ 13° „ 766 mm Druck.

	Berechnet	Gefunden
$2\,N_2$	25,70	17,31
$1\,N_2$	12,85	17,22

Man sieht daraus erstens, daß die beiden Peptide sich im wesentlichen gleich verhalten, zweitens, daß die Wirkung der salpetrigen Säure kein Mittel ist, um Amino- und Iminogruppen in den Polypep-

tiden scharf zu unterscheiden. In der Tat ergab der gleiche Versuch mit Glycylleucin,

$$CH_2(NH_2).CO.NHCH.(C_4H_9)(CO_2H),$$

dasselbe:

0,2120 g gaben 41,3 ccm Stickgas bei 19° und 774 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{16}O_3N_2$	Gefunden
2 N_2	29,94	22,04

Diese Resultate erklären sich nur, wenn man annimmt, daß durch die salpetrige Säure teilweise auch die Iminogruppe, vielleicht nach vorhergehender Hydrolyse, angegriffen wird.

Ferner wurde noch ein ähnlicher Versuch mit dem α-Bromisocapronylisoserin ausgeführt. Es enthält beide Isomere; wäre darunter eines mit einer Aminogruppe, so sollte man vermuten, daß wenigstens diese durch die salpetrige Säure abgelöst würde. Bei Anwendung von $1^1/_2$ Mol. Salzsäure und $1^1/_2$ Mol. Nitrit wurde hier aber nur eine sehr geringe Menge Stickstoff erhalten, die nicht größer war, als die Quantität, welche bei einem blinden Versuche gefunden wurde und also durch die Methode bedingt ist.

Das gleiche Resultat gab endlich die Prüfung der Hippursäure und des Hippurylisoserins. Bezüglich dieser letzten Verbindung steht die Beobachtung in Widerspruch mit der Angabe von Theodor Curtius[1]) und mit der von ihm daraus gezogenen Schlußfolgerung, daß die Verbindung das Hippuryl nicht an Stickstoff, sondern an Sauerstoff gebunden enthalte.

Die gleichzeitig von Curtius für seine Ansicht herangezogene Senföl- und Isonitrilprobe sind ebensowenig für die Begründung seiner Ansicht entscheidend, denn wenn sie überhaupt positiv ausfallen, was von besonderen Bedingungen abzuhängen scheint, so können sie durch Produkte einer tiefer gehenden Zersetzung veranlaßt sein. Da auch der Mangel an basischen Eigenschaften beim Hippurylisoserin gegen die Anwesenheit einer freien Aminogruppe spricht, und da ferner der Ester nicht einmal alkalisch reagiert, so ist die Strukturformel von Curtius,

$$C_6H_5CO.NHCH_2CO.O.CH(CH_2NH_2)CO_2H,$$

wahrscheinlich nicht richtig und wäre durch die Formel:

$$C_6H_5CO.NHCH_2CO.NHCH_2.CH(OH).CO_2H$$

zu ersetzen.

---

[1]) Journ. f. prakt. Chem. [2] 70, 195 [1904].

6. Derviate der α-Aminobuttersäure

von Karl Raske.

Obschon die α-Aminobuttersäure bisher in den natürlichen Proteïnstoffen nicht sicher nachgewiesen werden konnte, so steht sie doch einerseits dem weitverbreiteten Alanin und andererseits der Aminovaleriansäure so nahe, daß es von Interesse schien, einige Polypeptide daraus darzustellen. Als Ausgangsmaterial für die beiden hier zu beschreibenden Dipeptide war das bisher unbekannte

α-Brombutyrylchlorid, $CH_3.CH_2.CHBr.COCl$,

nötig. Für seine Darstellung wurden 100 g trockne destillierte α-Brombuttersäure mit 140 g Phosphorpentachlorid (etwas mehr als 1 Mol.) zusammengebracht und nach Beendigung der lebhaften Reaktion die, wenn nötig, über Glaswolle filtrierte Flüssigkeit unter 25 mm Druck fraktioniert. Nachdem das Phosphoroxychlorid bei 25° übergegangen war (95 g), stieg das Thermometer rasch auf 45° und bis 50° destillierten 88 g Brombutyrylchlorid. Dies Produkt kann noch eine kleine Menge von Phosphorpentachlorid enthalten, das übrigens für die Synthese kaum hinderlich ist und das sich auch bei mehrtägigem Stehen fast vollständig kristallinisch abscheidet. Für die Analyse wurde das Chlorid nochmals bei 12 mm Druck fraktioniert. Der Siedepunkt lag dann bei 43°.

0,3264 g gaben 0,5884 AgBr + AgCl nach Behandeln mit Chlor 0,5108 AgCl.

	Berechnet für C_4H_6BrOCl (Molgew. 185,5)	Gefunden
Br	43,13	42,72
Cl	19,14	19,76

Das Chlorid ist eine farblose, schwere Flüssigkeit von sehr unangenehmem Geruch.

α-Brombutyryl-glycin, $CH_3.CH_2.CHBr.CO.NH.CH_2.COOH$.

5 g Glykocoll werden in 67 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst und zu der durch eine Kältemischung gekühlten Flüssigkeit in üblicher Weise 12,5 g (1 Mol.) Brombutyrylchlorid und 98 ccm *n*-Natronlauge gegeben. Bei der zweiten Menge des Alkalis ist viel mehr als ein Mol. anzuwenden, weil ein Teil des Chlorids in Brombuttersäure verwandelt wird.

Nach Beendigung der Operation, die etwa $^3/_4$ Stunden dauert, wird mit 33 ccm fünffach *n*-Salzsäure übersättigt, wobei keine Fällung eintritt.

Zur Isolierung des Brombutyrylglycins kann man direkt ausäthern, noch besser aber ist es, die Flüssigkeit unter stark vermindertem Druck einzudampfen und den Rückstand sorgfältig mit Äther auszulaugen. Beim Verdampfen des Äthers bleibt ein Öl, das mit Petroläther behandelt nach einiger Zeit kristallisiert, während die Brombuttersäure in Lösung bleibt.

Die Ausbeute betrug 12,9 g oder 86% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wird in warmem Äther gelöst und die eingeengte Lösung mit Petroläther versetzt. Dabei fällt zuerst ein farbloses Öl, das beim Reiben bald kristallisiert. Für die Analyse wurde im Vakuum über Paraffin getrocknet.

0,1988 g gaben 0,2360 CO_2 und 0,0804 H_2O.
0,2399 g „ 13,3 ccm Stickgas bei 18° und 755 mm Druck.
0,1616 g „ 0,1351 AgBr.

	Berechnet für $C_6H_{10}BrNO_3$ (Molgew. 224)	Gefunden
C	32,14	32,38
H	4,47	4,52
N	6,25	6,36
Br	35,71	35,58

Die Substanz schmilzt nicht ganz konstant zwischen 101° und 105° (korr.). Sie ist leicht löslich in Alkohol und Aceton, etwas schwerer in Wasser und Äther und fast unlöslich in Petroläther.

α-Aminobutyryl-glycin,
$CH_3.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.COOH$.

Wird das α-Brombutyrylglycin mit der fünffachen Menge wässerigem Ammoniak von 25% übergossen und bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt, so tritt zwar keine völlige Lösung ein, aber trotzdem geht der Austausch des Halogens gegen Amid sehr glatt von statten und ist nach 5—6 Tagen beendet. Man verdampft dann Flüssigkeit samt Niederschlag unter vermindertem Druck zur Trockne und kocht zur Lösung des Bromammoniums den Rückstand mit absolutem Alkohol aus. Das hierbei ungelöst bleibende Dipeptid wird in wenig heißem Wasser gelöst und die, wenn nötig, filtrierte Flüssigkeit mit dem drei- bis vierfachen Volumen absolutem Alkohol versetzt. Nach kurzer Zeit beginnt die Abscheidung des Dipeptids, das nach 24 Stunden abgesaugt wird. Beim Aufarbeiten der Mutterlauge erhält man eine zweite, aber kleinere Menge. Die Gesamtausbeute betrug 2,9 g auf 5 g Bromkörper, mithin 83% der Theorie.

Für die Analyse war das Dipeptid nochmals in Wasser gelöst, wieder mit Alkohol gefällt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1681 g gaben 0,2762 CO_2 und 0,1153 H_2O.
0,1510 g „ 22,7 ccm Stickgas bei 15° und 756 mm Druck.

	Berechnet für $C_6H_{12}N_2O_3$ (Molgew. 160)	Gefunden
C	45,0	44,81
H	7,5	7,67
N	17,5	17,49

Das Dipeptid bildet ein kristallinisches Pulver von wenig charakteristischer Form. Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohre beginnt es gegen 200° braun zu werden, schmilzt gegen 220° (korr.) und geht dabei in das später beschriebene Anhydrid über.

Es löst sich leicht in Wasser und ist fast geschmacklos. In den üblichen indifferenten organischen Lösungsmitteln ist es fast unlöslich. Die wässerige Lösung reagiert schwach sauer und löst beim Kochen Kupferoxyd mit dunkelblauer Farbe. Das Kupfersalz ist nicht allein sehr leicht in Wasser, sondern auch ziemlich leicht in Alkohol löslich und wird aus der alkoholischen Lösung durch Äther gefällt.

α-Aminobutyryl-glycin-anhydrid,

$$CH_3.CH_2.CH\langle{}^{CO.NH}_{NH.CO}\rangle CH_2,$$

(Äthyldiketopiperazin).

Es entsteht beim Schmelzen des Dipeptids. Da aber dabei eine teilweise tiefergehende Zersetzung eintritt, so ist es ratsam, nur kleine Mengen (einige Gramm) auf einmal zu verarbeiten und das Erhitzen im Ölbade auf 225—230° nur 5—10 Minuten dauern zu lassen, bis die Masse ruhig schmilzt. Die beim Erkalten erstarrende dunkle Masse wird in der fünffachen Menge heißem Wasser gelöst und durch wiederholtes Aufkochen mit Tierkohle entfärbt. Beim Abkühlen scheidet sich das Anhydrid in mikroskopisch kleinen, rhombenähnlichen Täfelchen ab. Die Ausbeute beträgt 50—60% der Theorie. Der Verlust ist durch die Bildung und schwierige Entfernung der dunklen Produkte erklärlich.

Zur Analyse wurde nochmals aus heißem Wasser umgelöst und bei 100° getrocknet.

0,1709 g gaben 0,3194 CO_2 und 0,1100 H_2O.
0,1495 g „ 25,6 ccm Stickgas bei 18° und 752 mm Druck.

	Berechnet für $C_6H_{10}N_2O_2$ (Molgew. 142)	Gefunden
C	50,70	50,97
H	7,04	7,20
N	19,72	19,61

Die Verbindung schmilzt bei 237—239° (korr.) zu einer hellbraunen Flüssigkeit. Sie ist in kaltem Wasser schwer löslich und zeigt keine basischen Eigenschaften mehr.

α-Brombutyryl-α-aminobuttersäure,
$CH_3.CH_2.CHBr.CO.NH.CH.(C_2H_5).COOH$.

Die Verbindung entsteht in zwei isomeren Formen bei der Einwirkung des Brombutyrylchlorids auf die entsprechende Aminobuttersäure. Sie lassen sich wegen ihrer verschiedenen Löslichkeit in Wasser verhältnismäßig leicht trennen. Die schwer lösliche Form wird wieder durch A bezeichnet.

10 g α-Aminobuttersäure, die nach Vorschrift von E. Fischer und A. Mouneyrat[1]) dargestellt war, wurden in 97 ccm (1 Mol.) *n*-Natronlauge gelöst, in einer Kältemischung gekühlt und dazu in der üblichen Weise 18 g α-Brombutyrylchlorid (1 Mol.) und 154 ccm *n*-Natronlauge im Laufe einer Stunde gegeben. Als zum Schluß mit 50 ccm fünffach *n*-Salzsäure übersättigt war, begann alsbald die Abscheidung des festen Bromkörpers. Er wurde nach einstündigem Stehen bei 0° abgesaugt. Seine Menge betrug 13,5 g, und er bestand zum größten Teil aus der Verbindung A.

Zur Gewinnung des leicht löslichen Teils wurde das Filtrat unter stark vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand mit Äther ausgelaugt. Beim Verdampfen des ätherischen Auszugs blieb ein Öl, das bei der Behandlung mit Petroläther kristallinisch erstarrte. Seine Menge betrug 8 g und mithin die Gesamtausbeute 21,5 g oder 88% der Theorie.

α-Brombutyryl-α-aminobuttersäure A. Zur völligen Reinigung des aus der wässerigen Lösung direkt ausgefällten Präparates genügt einmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser, wobei allerdings nur die Hälfte zurückgewonnen wird. In der Mutterlauge bleibt ein Gemisch der beiden Isomeren, das man durch Verdampfen unter geringem Druck zurückgewinnen und durch erneute Kristallisation trennen kann. Die reine Verbindung A kristallisiert aus Wasser in kleinen, meist büschelförmig angeordneten Nadeln vom Schmelzp. 133° (korr.), der sich beim weiteren Umkristallisieren aus Wasser nicht mehr verändert.

Zur Analyse war im Vakuum über Natronkalk und Chlorcalcium getrocknet.

0,1825 g gaben 0,2572 CO_2 und 0,0915 H_2O.
0,2922 g „ 14,3 ccm Stickgas bei 18° und 771 mm Druck.
0,2145 g „ 0,1582 AgBr.

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2387 [1900]. (*S. 136.*)

	Berechnet für $C_8H_{14}BrNO_3$ (Molgew. 252)	Gefunden
C	38,10	38,43
H	5,55	5,61
N	5,55	5,72
Br	31,74	31,39

Die Substanz ist in Alkohol, Essigäther und Äther leicht, dagegen schwer löslich in kaltem Benzol und fast unlöslich in Petroläther.

α-Brombutyryl-α-aminobuttersäure B. Sie bildet die Hauptmenge des Präparates, das wie oben angegeben durch Eindampfen der wässerigen Mutterlauge und Ausäthern des Rückstandes gewonnen wird. Zur weiteren Reinigung wird das Rohprodukt in gelinder Wärme (etwa 40°) mit soviel Benzol behandelt, daß etwa $^1/_{10}$ ungelöst bleibt. Man läßt dann erkalten, wobei von neuem eine Abscheidung der schwer löslichen Verbindung A erfolgt, filtriert schließlich und verdampft die Lösung auf ein kleines Volumen, wobei die Verbindung B ebenfalls auskristallisiert. Man filtriert und unterwirft die Kristalle nochmals dem gleichen Reinigungsverfahren. Man gewinnt so ein Präparat, dessen Schmelzpunkt bei 95° (korr.) liegt, und das sicherlich zum allergrößten Teil aus der Verbindung B besteht. Ob ihm kleine Mengen von A beigemengt sind, läßt sich nicht bestimmt sagen. Jedenfalls blieb der Schmelzpunkt beim weiteren Umkristallisieren aus Benzol derselbe, stieg aber beim Umkristallisieren aus Wasser um 2°.

Die Verbindung unterscheidet sich von dem Isomeren nicht allein durch den Schmelzpunkt, sondern auch durch die viel größere Löslichkeit in Wasser und Benzol, dagegen gleicht sie ihm in der Form der Kristalle.

Für die Analyse war auch im Vakuum über Natronkalk und Chlorcalcium getrocknet.

0,1859 g gaben 0,2588 CO_2 und 0,0952 H_2O.
0,1847 g „ 8,8 ccm Stickgas bei 16° und 769 mm Druck.
0,1641 g „ 0,1232 AgBr.

	Berechnet für $C_8H_{14}BrNO_3$ (Molgew. 252)	Gefunden
C	38,10	37,97
H	5,55	5,73
N	5,55	5,62
Br	31,74	31,95

α-Aminobutyryl-α-aminobuttersäure,

$CH_3.CH_2.CH(NH_2)CO.NH.CH(C_2H_5).COOH$.

Den beiden vorhergehenden Bromkörpern entsprechen zwei stereoisomere Dipeptide, die auf die gleiche Art gewonnen werden. Die Bromverbindung wird in der fünffachen Menge wässerigem Ammoniak

von 25% gelöst und bei Zimmertemperatur 5—7 Tage aufbewahrt, bis alles Brom abgespalten ist. Dann wird die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft.

Dipeptid A. Behandelt man den Verdampfungsrückstand zur Lösung des Bromammoniums mit heißem Alkohol, so bleibt das Dipeptid zurück. Es wird in wenig heißem Wasser gelöst und die Flüssigkeit mit dem drei- bis vierfachen Volumen absolutem Alkohol versetzt. Nach einiger Zeit beginnt die Kristallisation des Dipeptids, schreitet aber so langsam vorwärts, daß auch nach 24 Stunden noch ein erheblicher Teil in Lösung ist. Um größere Verluste zu vermeiden, muß deshalb auch die Mutterlauge verarbeitet werden. Aus 4 g Bromkörper wurden 2 g oder 67% der Theorie an Dipeptid gewonnen.

Für die Analyse war im Vakuum über Chlorcalcium getrocknet.

0,1503 g gaben 0,2806 CO_2 und 0,1172 H_2O.
0,1751 g ,, 23,1 ccm Stickgas bei 20° und 753 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{16}N_2O_3$ (Molgew. 188)	Gefunden
C	51,06	50,92
H	8,51	8,72
N	14,89	14,96

Die Verbindung bildet feine, glänzende Blättchen, die beim raschen Erhitzen gegen 260° sich leicht bräunen und gegen 265° (korr. 273°) schmelzen, wobei das Anhydrid entsteht.

Das Dipeptid ist in Wasser recht leicht löslich, dagegen in den indifferenten organischen Lösungsmitteln fast unlöslich. Die wässerige Lösung reagiert auf Lakmus schwach sauer, ist fast geschmacklos und löst Kupferoxyd beim Kochen leicht mit tiefblauer Farbe. Das Kupfersalz ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich und scheidet sich aus heißem Wasser in derben, flächenreichen Kristallen ab.

Dipeptid B. Es entsteht aus der bei 95° schmelzenden Bromverbindung. Behandelt man den Verdampfungsrückstand der ammoniakalischen Lösung mit Alkohol, so löst er sich bis auf einen geringen Rest; läßt man aber die filtrierte Flüssigkeit mehrere Tage stehen, so scheidet sich das Dipeptid kristallinisch aus. Das Produkt enthält anfangs noch etwas Brom, das sich aber jetzt leicht durch Auskochen mit Alkohol entfernen läßt, worin das kristallisierte Dipeptid fast unlöslich ist. Die Ausbeute an diesem bromfreien Präparate betrug 83% der Theorie. Zur Reinigung wird das Dipeptid in sehr wenig warmem Wasser gelöst und die Lösung mit dem sechsfachen Volumen absolutem Alkohol versetzt. Die Kristallisation erfolgt aber recht langsam und ist auch nach mehreren Tagen noch sehr unvollkommen. Man muß deshalb die Mutterlauge verdampfen und mit dem Rückstande die Operation wiederholen.

Für die Analyse war bei 110° getrocknet, wobei die im Exsikkator getrocknete Substanz nicht unerheblich (4,3%) an Gewicht verlor.

0,1598 g gaben 0,2985 CO_2 und 0,1219 H_2O.
0,1620 g „ 20,4 ccm Stickgas bei 15,5° und 768 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{16}N_2O_3$ (Molgew. 188)	Gefunden
C	51,06	50,95
H	8,51	8,53
N	14,89	14,90

Das Dipeptid B färbt sich im Kapillarrohre gegen 240° braun und geht unter Schmelzung gegen 250° (korr. 257°) ebenfalls in Anhydrid über. Es bildet mikroskopische derbe Nadeln und Prismen, die teils schräg abgeschnitten, teils zugespitzt und meist zu Drusen vereinigt sind.

Von der Verbindung A, der es im allgemeinen sehr gleicht, unterscheidet es sich durch die größere Löslichkeit in Wasser und langsamere Kristallisation. Auch sein Kupfersalz ist leicht löslich in Wasser und kristallisiert daraus in mikroskopischen kurzen Prismen.

α-Aminobuttersäureanhydrid (Diäthyldiketopiperazin),

$$C_2H_5.CH\langle{}^{CO.NH}_{NH.CO}\rangle CH.C_2H_5.$$

Beide zuvor beschriebenen Dipeptide schmelzen unter schwachem Aufschäumen und Bildung von Anhydrid. Das Produkt hat in beiden Fällen so ähnliche Eigenschaften, daß seine Gleichheit sehr wahrscheinlich ist. Da aber zur völligen Sicherung der Identität ein ausführlicherer Vergleich nötig erscheint, so mögen hier die beiden Produkte getrennt beschrieben werden.

1. Erhitzt man das Dipeptid A in nicht zu großer Menge (etwa 1 g) im Reagensglase über freier Flamme bis zum Schmelzen, so schäumt es schwach auf, bräunt sich, und gleichzeitig sublimiert ein kleiner Teil des Anhydrids. Die Umwandlung ist nach einigen Minuten vollendet. Beim Erkalten erstarrt die Schmelze strahlig-kristallinisch. Sie löst sich in heißem Wasser mit hellbrauner Farbe, wird aber durch Kochen mit Tierkohle leicht entfärbt und beim Erkalten des Filtrats scheidet sich dann das Anhydrid als farblose Masse ab, die aber unter dem Mikroskop keine deutlichen Kristallformen zeigt. Die erste Kristallisation des Anhydrids betrug die Hälfte vom angewandten Dipeptid, und bei Verarbeitung der Mutterlauge stieg die Ausbeute auf etwa 90% der Theorie. Zur Analyse war nochmals aus heißem Wasser umkristallisiert und bei 110° getrocknet.

0,1580 g gaben 0,3285 CO_2 und 0,1181 H_2O.
0,1467 g „ 21,3 ccm Stickgas bei 17⁰ und 752 mm Druck.

	Berechnet für $C_8H_{14}N_2O_2$ (Molgew. 170)	Gefunden
C	56,47	56,71
H	8,24	8,35
N	16,47	16,71

Das Anhydrid schmilzt bei 260⁰ (korr. 267⁰) zu einer schwach gelben Flüssigkeit.

Von dem Dipeptid unterscheidet es sich durch die Indifferenz gegen kalte verdünnte Säuren, durch die geringe Löslichkeit in kaltem Wasser und durch die ziemlich große Löslichkeit in heißem Alkohol.

2. Das Dipeptid B verhält sich beim Erhitzen ganz ähnlich wie A, nur tritt die Schmelzung einige Grade niedriger ein. Die Umwandlung in das Anhydrid und dessen Reinigung wurden genau so wie vorher ausgeführt. Das Produkt zeigte denselben Schmelzpunkt und, soweit man es nach kleinen Proben beurteilen kann, die gleichen Löslichkeitsverhältnisse. Auch in der Art der Kristallisation und der Form der Kristalle war kein Unterschied zu erkennen. Für die Analyse war ebenfalls bei 110⁰ getrocknet.

0,1188 g gaben 0,2453 CO_2 und 0,0892 H_2O.
0,0801 g „ 11,6 ccm Stickgas bei 18⁰ und 752 mm Druck.

	Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2$ (Molgew. 170)	Gefunden
C	56,47	56,31
H	8,24	8,40
N	16,47	16,59

7. Dipeptide des Phenylglycins mit Glykocoll, Alanin, Asparagin und Asparaginsäure

von Julius Schmidlin.

Als Ausgangsmaterial für die Bereitung dieser Peptide dienten die Verbindungen der Phenylbromessigsäure mit den entsprechenden Aminosäuren. Sie wurden bereitet in der bekannten Weise durch Einwirkung von Phenylbromessigsäurechlorid auf die alkalischen Lösungen der Aminosäuren.

Phenylbromessigsäure wird am leichtesten aus Mandelsäure nach der Vorschrift von Walden[1]) durch Behandlung mit Phosphorpentabromid gewonnen; dabei entsteht zunächst das Bromid. Man könnte auch dieses für die Synthese verwenden; da aber seine Reinigung durch

[1]) Walden, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 28, 1296 [1895].

Fraktionierung des Rohproduktes unbequem ist, so wurde das Bromid erst durch Zersetzen mit Wasser in die Säure verwandelt.

Phenylbromessigsäurechlorid, $C_6H_5.CHBr.COCl$.

Wird die Phenylbromessigsäure mit der gleichen Menge frischem Phosphorpentachlorid vermischt, so verflüssigt sie sich sehr rasch unter Bildung des Chlorides. Zum Schlusse gießt man die bräunlichgelbe Flüssigkeit vom unveränderten Phosphorpentachlorid ab und fraktioniert unter vermindertem Druck.

Zweimalige Rektifikation gab ein farbloses Präparat, das bei 117 bis 118° unter 18 mm Druck kochte. Die Ausbeute betrug 84 g aus 95 g roher Phenylbromessigsäure oder 81% der Theorie.

0,6396 g gaben 0,9071 AgBr + AgCl nach dem Erhitzen im Chlorstrome 0,7874 AgCl.

	Berechnet für C_8H_6OBrCl (Molgew. 233,5)	Gefunden
Cl	15,20	15,52
Br	34,26	33,64

Zur Analyse sind alle folgenden Substanzen, falls keine besondere Angabe gemacht wird, im Vakuumexsikkator über Phosphorsäureanhydrid getrocknet.

Phenylbromacetyl-glycin, $C_6H_5.CHBr.CO.NH.CH_2.COOH$.

12,1 g Glycin werden in 161 ccm *n*-Natronlauge gelöst und dazu unter Umschütteln und Eiskühlung allmählich und abwechselnd 36 g Phenylbromessigsäurechlorid und 165 ccm *n*-Lauge zugefügt. Auf Zusatz von 161 ccm *n*-Salzsäure fällt ein schwach gelblich gefärbtes Öl aus, das beim Reiben mit Petroläther kristallinisch erstarrt. Das Rohprodukt wog 33 g, entsprechend 80% der Theorie.

Durch wiederholtes Lösen in heißem Benzol und Fällen mit Petroläther wurde die Substanz in farblosen, feinen Nadeln vom Schmelzpunkt 105—108° (korr. 106—109°) erhalten. Der Körper ist schwer löslich in kaltem, leichter löslich in heißem Wasser, leicht löslich in Alkohol, Äther, heißem Benzol, unlöslich in Petroläther.

0,2437 g gaben 0,3970 CO_2 und 0,0821 H_2O.
0,1869 g „ 8,3 ccm Stickgas bei 14,2° und 754 mm Druck.
0,1837 g „ 0,1261 AgBr.

	Berechnet für $C_{10}H_{10}O_3NBr$ (Molgew. 272)	Gefunden
C	44,12	44,43
H	3,68	3,74
N	5,14	5,18
Br	29,41	29,18

Phenylglycyl-glycin, $C_6H_5.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.COOH$.

16,7 g Phenylbromacetylglycin wurden in 100 ccm Ammoniak gelöst und nach sechstägigem Stehen bei Zimmertemperatur war der Umtausch von Brom gegen Amid beendet. Beim Eindampfen der Lösung unter vermindertem Druck erfolgte bereits die Ausscheidung des schwer löslichen Peptids. Die Mutterlauge, die durch ihren Gehalt an Ammoniak noch einen Teil des Peptids in Lösung hielt, wurde im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand durch Auslaugen mit wenig heißem Wasser vom Bromammonium befreit, wobei das schwer lösliche Peptid hinterblieb. Ausbeute 8,9 g, entsprechend 64% der Theorie.

Zur Reinigung wurde aus Wasser umgelöst. Da aber die Löslichkeit in der Hitze nur wenig größer ist als in der Kälte, so ist es nötig, die wässerige Lösung einzudampfen, wobei sich längliche Blättchen abscheiden, die beim raschen Erhitzen gegen 243° (korr. 248°) unter Braunwerden und Gasentwickelung schmelzen. Die Substanz ist ziemlich schwer löslich in kaltem und auch in heißem Wasser; 1 L Wasser löst etwa 8 g auf. Auch in Alkohol ist das Peptid ziemlich schwer löslich, in Äther, Benzol und Petroläther ist es nahezu unlöslich. In verdünnter Salzsäure und Alkalien ist es leicht löslich. Zur Analyse wurde über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1214 g gaben 0,2571 CO_2 und 0,0643 H_2O.
0,2510 g „ 28,4 ccm Stickgas bei 15° und 763 mm Druck.

	Berechnet für $C_{10}H_{12}N_2O_3$ (Molgew. 208)	Gefunden
C	57,69	57,75
H	5,77	5,88
N	13,46	13,31

Kupfersalz des Phenylglycyl-glycins, $C_{10}H_{10}N_2O_3Cu$.

Kocht man die wässerige Lösung des Dipeptids längere Zeit mit gefälltem Kupferoxyd, so färbt sie sich stark blau, und beim Eindampfen des Filtrates fällt das Kupfersalz in hellblau gefärbten, einseitig zugespitzten, langgestreckten Blättchen aus. In Wasser ist es noch etwas schwerer löslich als das Dipeptid, in Alkohol ist es fast unlöslich. Wie die Analyse zeigt, sind zwei Wasserstoffatome durch Cu ersetzt.

0,1824 g gaben 0,2970 CO_2, 0,0649 H_2O und 0,0528 CuO.

	Berechnet für $C_{10}H_{10}N_2O_3Cu$ (Molgew. 269,6)	Gefunden
C	44,51	44,41
H	3,71	3,95
Cu	23,37	23,09

Phenylglycyl-glycinanhydrid,

$$\begin{array}{l} C_6H_5.CH.CO.NH \\ \quad\quad\;\; | \quad\quad\;\; | \\ \quad\quad NH.CO.CH_2 \end{array}$$

(Phenyldiketopiperazin).

Das Anhydrid bildet sich beim Schmelzen des Phenylglycylglycins, läßt sich aber nur mit großem Verluste von anderen Zersetzungsprodukten trennen. Viel leichter wird es aus Phenylglycylglycinester mit alkoholischem Ammoniak gewonnen.

1,8 g Phenylglycylglycin wurden mit 25 ccm absolutem Alkohol überschichtet und die Flüssigkeit mit Salzsäuregas gesättigt. Nach dem Einengen im Vakuum bei 40° begann das Chlorhydrat des Esters sich kristallinisch aus dem Sirup abzuscheiden. Nach Zusatz von 40 ccm bei 0° gesättigtem alkoholischen Ammoniak und längerem Digerieren auf dem Wasserbade wurde vom abgeschiedenen Chlorammonium abfiltriert, im Vakuum zur Trockne verdampft und dann mit 50 ccm heißem Wasser gelöst. Aus der mit Tierkohle entfärbten Lösung fiel das Anhydrid in feinen, zu Büscheln vereinigten, farblosen, langen Nadeln aus. Die Ausbeute betrug 0,85 g an reinem Produkt, entsprechend 51% der Theorie.

Die Substanz schmilzt bei 235° (korr. 240°) unter Schwarzfärbung. Sie ist löslich in heißem Wasser und zwar erheblich leichter als das Dipeptid, ziemlich leicht löslich in Alkohol, unlöslich in Äther, Benzol, Chloroform, leicht löslich dagegen in Eisessig. Im Gegensatze zum Dipeptid wird das Anhydrid von verdünnter Salzsäure nicht leichter gelöst als von Wasser.

0,0950 g gaben 0,2202 CO_2 und 0,0459 H_2O.
0,0824 g ,, 10,0 ccm Stickgas bei 15° und 766 mm Druck.

	Berechnet für $C_{10}H_{10}N_2O_2$ (Molgew. 190)	Gefunden
C	63,15	63,21
H	5,26	5,37
N	14,73	14,32

Phenylbromacetyl-alanin,

$$C_6H_5.CHBr.CO.NH.CH.(CH_3)COOH.$$

Durch Kombination des Phenylbromacetylchlorids mit Alanin entstehen die beiden durch die Theorie vorausgesehenen racemischen Isomeren, welche durch die Buchstaben A und B unterschieden werden sollen.

10,6 g Alanin wurden in 120 ccm *n*-Natronlauge gelöst und bei 15° abwechselnd 28 g Phenylbromessigsäurechlorid und weitere 140 ccm

n-Natronlauge zugegeben. Zur Beendigung der Reaktion wurde noch eine Stunde auf der Maschine geschüttelt. Durch Zusatz von 120 ccm n-Salzsäure wurde ein öliges Produkt gefällt, das in der Kälte sofort erstarrte. Die getrocknete weiße Masse betrug 25 g oder 73% der Theorie.

Zur Entfernung der Phenylbromessigsäure wurde erst mit wenig Benzol ausgekocht und das Produkt dann in 100 ccm warmem Alkohol gelöst.

Auf Zusatz von 50 ccm Wasser fielen sofort 3,45 g vom Schmelzpunkt 159—160° aus. Nach längerem Stehen gab das Filtrat weitere 4,1 g vom Schmelzp. 147—155°. Aus der Mutterlauge fielen auf abermaligen Zusatz von 100 ccm Wasser 7,4 g vom Schmelzp. 141—145°. Weiterer Wasserzusatz von 400 ccm gab keine Abscheidung mehr.

Von den 25 g Rohprodukt wurden auf diese Weise nur insgesamt 15 g zurückerhalten; der Rest hinterbleibt selbst beim vorsichtigen Eindampfen bei 30° unter vermindertem Druck als löslicher Sirup, weil der Bromkörper leicht durch warmes Wasser zersetzt wird, das Brom gegen Hydroxyl austauscht und in das später beschriebene Derivat der Mandelsäure übergeht.

Die weitere Trennung der isomeren Bromkörper geschah durch fraktionierte Kristallisation aus Äthylacetat. Das Endresultat war 3,6 g vom Schmelzp. 167—168° und 6,7 g vom Schmelzp. 146—147°.

Phenylbromacetyl-alanin A vom Schmelzp. 167—168° (korr. 170—171°). Der Schmelzpunkt ist nicht ganz konstant, da sogleich Zersetzung eintritt. Die Verbindung kristallisiert aus Essigester in Nadeln. In kaltem Wasser ist sie schwer löslich, in heißem Wasser löst sie sich erheblich leichter, wird aber dabei, besonders beim Kochen, ziemlich rasch zersetzt. Löst sich schwer in Äther und Benzol.

0,1255 g gaben 0,2138 CO_2 und 0,0509 H_2O.
0,2530 g „ 10,8 ccm Stickgas bei 17,5° und 751 mm Druck.
0,1816 g „ 0,1205 AgBr.

	Berechnet für $C_{11}H_{12}O_3NBr$ (Molgew. 286)	Gefunden
C	46,15	46,45
H	4,20	4,50
N	4,89	4,89
Br	27,97	28,19

Phenylbromacetyl-alanin B schmilzt gegen 146—147° (korr. 148—151°) ebenfalls unter Gasentwickelung. Entsprechend dem niedrigen Schmelzpunkte ist es auch leichter löslich als die Verbindung A. Aus Essigester kristallisiert die Substanz in kurzen Nadeln. Gegenüber Wasser ist sie ebenso unbeständig wie das Isomere.

0,3517 g gaben 0,5993 CO_2 und 0,1355 H_2O.
0,4037 g „ 16,0 ccm Stickgas bei 17,5° und 752 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{12}O_3NBr$ (Molgew. 286)	Gefunden
C	46,15	46,48
H	4,20	4,28
N	4,89	4,54
Br	27,97	28,16

Phenyloxyacetyl-alanin, $C_6H_5.CH(OH).CO.NH.CH.(CH_3)COOH$.

Die beiden zuvor abgehandelten Bromkörper tauschen beim Erhitzen mit Wasser das Halogen gegen Hydroxyl aus, wodurch beim Umkristallisieren aus Wasser bedeutende Verluste entstehen. Um die völlige Abspaltung des Broms zu bewerkstelligen, ist aber doch mehrstündiges Kochen erforderlich.

Als eine größere Menge des Gemisches der beiden Isomeren in dieser Weise zersetzt wurde, schied sich nach dem Eindampfen der Lösung und Abkühlen ein schön kristallisiertes, bromfreies Produkt ab, das nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser die Zusammensetzung $C_{11}H_{13}O_4N$ zeigte.

0,3707 g gaben 0,8008 CO_2 und 0,1958 H_2O.
0,4386 g „ 23,5 ccm Stickgas bei 17° und 748 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{13}O_4N$ (Molgew. 223)	Gefunden
C	59,15	58,92
H	5,83	5,87
N	6,28	6,12

Die Verbindung ist in Alkohol und heißem Wasser leicht löslich, und auch von kaltem Wasser wird sie in erheblicher Menge aufgenommen, dagegen ist sie schwer löslich in Benzol und Äther. Aus Wasser erhält man nadelige Kristallaggregate vom Schmelzp. 140—143° (korr. 142 bis 145°).

Leider konnte bisher aus Mangel an Material nicht festgestellt werden, welcher der beiden Bromverbindungen dieses Derivat entspricht.

Phenylglycyl-alanin, $C_6H_5CH(NH_2)CO.NH.CH(CH_3)COOH$.

Phenylglycyl-alanin A. Wird das Phenylbromacetylalanin A mit der fünffachen Menge Ammoniak von 25% gelöst und die Flüssigkeit bei gewöhnlicher Temperatur aufgehoben, so ist die Abspaltung des Broms in 2—3 Tagen beendet.

Nach dem Verdampfen des Ammoniaks unter vermindertem Druck bleibt eine farblose Masse zurück, die zunächst mit kaltem Wasser ausgelaugt wird.

Die Ausbeute an schwerlöslichem Dipeptid betrug 34% der Theorie, also viel weniger wie in den meisten anderen Fällen. Das Dipeptid zeigt große Ähnlichkeit mit dem Phenylglycylglycin, besonders auch bezüglich der Löslichkeit. Zum Umkristallisieren wird es wie jenes in heißem Wasser gelöst und dann die Flüssigkeit eingedampft. Man erhält so feine Blättchen, die gegen 244° (korr. 249°) unter Zersetzung schmelzen. Es ist in Alkohol sehr schwer löslich, in Äther unlöslich, dagegen leicht löslich in Mineralsäuren und Alkalien.

0,1331 g gaben 0,2910 CO_2 und 0,0769 H_2O.
0,1055 g „ 11,7 ccm Stickgas bei 17° und 754 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{14}O_3N_2$ (Molgew. 222)	Gefunden
C	59,46	59,62
H	6,31	6,41
N	12,61	12,76

Phenylglycyl-alanin B. Darstellung und Reinigung ist dieselbe wie bei dem Isomeren; die Ausbeute ist aber viel besser, sie entspricht 62% der Theorie. In Wasser ist es auch recht schwer löslich, es verlangt zur Lösung 300—400 Teile Wasser.

Beim Eindampfen der Lösung kristallisiert es in feinen Blättchen, die beim raschen Erhitzen gegen 234° (korr. 239°) schmelzen.

0,2301 g gaben 0,4990 CO_2 und 0,1358 H_2O.
0,0629 g „ 6,7 ccm Stickgas bei 17° und 754 mm Druck.

	Berechnet für $C_{11}H_{14}O_3N_2$ (Molgew. 222)	Gefunden
C	59,46	59,15
H	6,31	6,55
N	12,61	12,25

Phenylbromacetyl-asparagin,

$$C_6H_5.CHBr.CO.NH.CH(COOH).CH_2.CONH_2.$$

10 g *l*-Asparagin (Kristallwasser enthaltend) werden in 67 ccm *n*-Natronlauge gelöst und unter Kühlen mit Eiswasser und Schütteln abwechselnd portionenweise 15,5 g Phenylbromacetylchlorid und 72 ccm *n*-Natronlauge zugegeben. Die erhaltene Lösung ist nur schwach gelb gefärbt, sofern man gut gekühlt und die Reagentien in möglichst kleinen Portionen zugegeben hat. Arbeitet man dagegen bei Zimmertemperatur, so erhält man eine stark orange gefärbte Flüssigkeit. Die Menge dieser

Verunreinigung ist indes ganz unbedeutend, und man kann sie leicht entfernen, indem man die Flüssigkeit eine Stunde schüttelt, wobei sich der gefärbte Stoff zusammenballt und dann leicht abfiltriert werden kann.

Die farblose filtrierte Lösung wird mit 77 ccm *n*-Salzsäure versetzt, worauf eine weiße, milchige Ausscheidung erfolgt, die sich alsbald in ein kristallinisches Pulver verwandelt. Die Ausbeute betrug 19,5 g, entsprechend 89% der Theorie.

Das Rohprodukt wurde erst mit Petroläther ausgelaugt und dann durch Kochen mit Benzol von Phenylbromessigsäure befreit. Auch dieser Bromkörper verträgt längeres Erhitzen mit Wasser nicht, er ist aber nicht so empfindlich wie das Alaninderivat und läßt sich aus der zehnfachen Menge Wasser von 80° ohne große Verluste umkristallisieren.

Obschon das Phenylbromacetylasparagin nach der Bildung aus dem inaktiven Phenylbromacetylchlorid aus zwei isomeren Formen bestehen muß, so ist es nicht gelungen, diese durch Kristallisation aus dem Rohprodukte abzuscheiden.

Vielmehr verhält sich dieses wie ein scheinbar einheitlicher Körper, und man muß deshalb vorläufig annehmen, daß es sich um eine halbracemische Verbindung handelt.

Aus warmem Wasser kristallisiert sie in büschelig verwachsenen Nadeln, die bei 160—161° (korr. 163—164°) schmelzen. Derselbe Schmelzpunkt wurde nach dem Lösen in Alkohol und Fällen mit Äther gefunden.

In heißem Wasser löst sich die Substanz ziemlich leicht, in kaltem dagegen schwer, ebenso in Äther und Benzol. Von Alkohol und Äthylacetat wird sie ziemlich leicht gelöst.

0,3409 g gaben 0,5510 CO_2 und 0,1253 H_2O.
0,2536 g „ 18,7 ccm Stickgas bei 18° und 748 mm Druck.
0,2740 g „ 0,1553 AgBr.

	Berechnet für $C_{12}H_{13}N_2BrO_4$ (Molgew. 329)	Gefunden
C	43,80	44,08
H	3,95	4,08
N	8,51	8,38
Br	24,31	24,11

Das optische Drehvermögen ist in alkalischer Lösung recht gering.

1,3027 g Substanz gelöst in 4,6253 g *n*-Natronlauge und 4,3645 g Wasser.
Prozentgehalt der Lösung 12,66, spez. Gew. 1,0661.
Beobachtete Drehung im 1-Dezimeterrohre $\alpha = +0{,}45^\circ$.
Spezifisches Drehvermögen $[\alpha]_D^{20} = +3{,}33^\circ$.

Phenylglycyl-asparagin,

$C_6H_5CH(NH_2)CO.NH.CH(COOH).CH_2.CONH_2$.

Wird der vorhergehende Bromkörper in wässerigem Ammoniak von 25% gelöst und mehrere Tage bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt, so ist alles Brom abgespalten. Beim Verdampfen der Lösung unter stark vermindertem Druck bleibt ein Sirup zurück, der bei längerem Stehen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure kristallinisch wird. Durch Auslaugen mit verdünntem Alkohol läßt sich das Bromammonium leicht entfernen. Das zurückbleibende Peptid läßt sich durch Lösen in wenig heißem Wasser und nachheriges Fällen mit Alkohol und Äther reinigen. Die Ausbeute betrug 64% der Theorie.

0,1239 g gaben 0,2458 CO_2 und 0,0653 H_2O.
0,2993 g „ 41,5 ccm Stickgas bei 17° und 750 mm Druck.

	Berechnet für $C_{12}H_{15}N_3O_4$ (Molgew. 265)	Gefunden
C	54,33	54,10
H	5,66	5,83
N	15,73	15,87

Das Dipeptid kristallisiert in kleinen, kurzen Prismen. Es ist in Wasser ziemlich leicht, in Alkohol schwer und in Äther gar nicht löslich. Es schmilzt bei 232° (korr. 237°).

Das optische Drehvermögen ist wie beim Bromkörper sehr gering.

0,4450 g gelöst in 4,6345 g H_2O und 2,3242 g *n*-Natronlauge.
Prozentgehalt der Lösung 6,015; spez. Gew. 1,0263.
Beobachtete Drehung im 1-Dezimeterrohre $\alpha = -0{,}14°$.
Spezifisches Drehvermögen $[\alpha]_D^{20} = -2{,}3°$.

Phenylbromacetyl-asparaginsäure,

$C_6H_5.CHBr.CO.NH.CH(COOH)CH_2.COOH$.

20 g *l*-Asparaginsäure werden in 300 ccm *n*-Natronlauge gelöst und unter Umschütteln und Eiskühlung 35 g Phenylbromessigsäurechlorid und 170 ccm *n*-Natronlauge portionenweise zugegeben. Die filtrierte Flüssigkeit wird darauf im Kältegemisch stark gekühlt und langsam unter Rühren mit 60 ccm $^5/_1$ *n*-Salzsäure versetzt. Dabei scheidet sich eine flockige, zähe Masse ab und nach 12-stündigem Stehen ist die ganze Flüssigkeit von dieser Substanz so erfüllt, daß sie einer Gallerte ähnlich sieht. Unter dem Mikroskop erkennt man indessen, daß die Substanz aus Kügelchen von kristallinischem Gefüge besteht; dementsprechend läßt sie sich auch leicht filtrieren. Die Ausbeute betrug 36 g, entsprechend 73% der Theorie. Zur Entfernung von Phenylbromessigsäure wurde zuerst mit heißem Benzol ausgelaugt und der

Rückstand dann in 400 ccm heißem Wasser gelöst. Beim Abkühlen fällt der Bromkörper wieder in der eigentümlichen Form aus, welche die Flüssigkeit fast gallertartig erscheinen läßt. Bei wiederholtem Umkristallisieren bleibt der Schmelzpunkt bei 138—141⁰ (korr. 139—143⁰).

Bezüglich der Einheitlichkeit dieses Produktes gilt das beim Phenylbromacetylasparagin Gesagte.

Zur Analyse wurde erst während vier Stunden bei 100⁰ getrocknet und das Präparat dann über Phosphorpentoxyd aufbewahrt.

0,2558 g gaben 0,4098 CO_2 und 0,0874 H_2O.
0,3445 g „ 13,8 ccm Stickgas bei 18⁰ und 753 mm Druck.
0,3750 g „ 0,2112 AgBr.

	Berechnet für $C_{12}H_{12}BrO_5N$ (Molgew. 330)	Gefunden
C	43,64	43,69
H	3,64	3,80
N	4,24	4,58
Br	24,24	23,97

Optische Untersuchung:

0,8520 g gelöst in 6,8091 g H_2O und 1,3070 g *n*-Natronlauge.
Prozentgehalt der Lösung 9,5; spez. Gew. 1,0420.
Beobachtete Drehung im 1-Dezimeterrohre $\alpha = +0,36^0$.
Spezifisches Drehvermögen $[\alpha]_D^{20} = +3,6^0$.

Löst man die Bromverbindung in der vierfachen Menge Ammoniakwasser von 25% und läßt einige Tage stehen, so ist das Brom völlig abgespalten, und beim Verdampfen der Lösung bleibt ein Rückstand, aus dem man mit Alkohol das Bromammonium entfernen kann. Das in Alkohol schwer lösliche Peptid scheidet sich aus heißem Wasser, worin es sehr leicht löslich ist, in ähnlicher Form ab wie der Bromkörper. Der Schmelzpunkt liegt bei 198⁰ (korr. 201⁰). Leider hat die Analyse keine scharf stimmenden Zahlen gegeben.

Phenylbromacetyl-asparaginsäurediäthylester, $C_6H_5.CHBr.CO.NH.CH(CO_2C_2H_5)CH_2CO_2C_2H_5$.

Die Verbindung entsteht durch Einwirkung des Phenylbromacetylchlorids auf den Asparaginsäureester in ätherischer Lösung, und es ist dabei gleichgültig, ob man das Chlorid zum Ester oder umgekehrt gibt; auch die Mengenverhältnisse ändern das Resultat nur in bezug auf die Ausbeute, nicht aber in bezug auf die Qualität.

Es scheint also, daß hier wieder eine halbracemische Verbindung vorliegt, die schwer in die Bestandteile zu trennen ist. Nach der Theorie hätte man erwarten können, daß beim Zusammentreffen des aktiven

l-Asparaginsäureesters mit dem inaktiven Chlorid der eine Bestandteil des letzteren leichter gebunden werde. Dann hätte bei einem Überschuß des Chlorids der andere Bestandteil desselben übrig bleiben und mithin ein optisch-aktives Produkt entstehen müssen. Sorgfältige Versuche, die darauf abzielten, sind aber ganz resultatlos geblieben.

Für die Darstellung obiger Verbindung ist es deshalb am besten, zwei Mol. Asparaginsäureester in trocknem Äther zu lösen und dazu unter Schütteln ein Mol. Phenylbromessigsäurechlorid allmählich zuzufügen.

Dabei fällt salzsaurer Asparaginester aus, während der Phenylbromacetylasparaginsäureester in der ätherischen Lösung bleibt. Der Ester hinterbleibt heim Verdampfen des Äthers als Sirup, der aber bald beim Reiben kristallinisch erstarrt.

Er wird entweder durch Lösen in Alkohol und Fällen mit Wasser, oder durch Lösen in Benzol und Fällen mit Petroläther gereinigt und bildet kurze, dünne Nadeln vom Schmelzpunkt 69—70° (korr. 70—71°).

Schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol und ziemlich leicht löslich in Äther und Benzol, dagegen sehr schwer löslich in Petroläther.

0,2320 g gaben 0,4204 CO_2 und 0,1070 H_2O.
0,1869 g „ 8,3 ccm Stickgas bei 14,2° und 754 mm Druck.
0,2655 g „ 0,1267 AgBr.

	Berechnet für $C_{16}H_{20}O_5NBr$ (Molgew. 386)	Gefunden
C	49,74	49,41
H	5,18	5,12
N	3,63	3,91
Br	20,72	20,31

Optische Untersuchung:

0,3055 g gelöst in 5,5234 g Alkohol.
Prozentgehalt 5,241; spez. Gew. 0,8244.
Abgelesen im 1-Dezimeterrohre $\alpha = -0,57°$.
Spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{20} = -13,23°$.

Anhydro-phenylglycyl-asparagin,

$$\begin{array}{l} C_6H_5.CH—CO—NH \\ \quad\quad\;\; | \quad\quad\quad\quad | \\ \quad\quad NH—CO—CH.CH_2.CONH_2 . \end{array}$$

Dieses Piperazinderivat entsteht aus der vorhergehenden Verbindung bei Behandlung mit alkoholischem Ammoniak, und der Vorgang entspricht genau der Umwandlung des Chloracetylasparaginsäureesters in das Anhydroglycylasparagin[1]).

[1]) E. Fischer und W. Königs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 4589. (*S. 406.*)

2,5 g Phenylbromacetylasparaginsäurediäthylester wurden mit 30 ccm ganz kalt gesättigtem methylalkoholischem Ammoniak eine Stunde im Rohre auf 100° erhitzt. Nach dem Erkalten war die gelbliche Flüssigkeit von einem weißen, kristallinischen Niederschlage erfüllt, der sich als fast reines Anhydrid erwies. Die Mutterlauge gab beim Eindampfen im Vakuum noch mehr davon. Ausbeute 1,35 g, entsprechend 90% der Theorie.

Verschiedene durch Kristallisation erhaltene Fraktionen zeigten alle kein Drehvermögen.

0,1123 g gaben 0,2415 CO_2 und 0,0541 H_2O.
0,0914 g „ 13,0 ccm Stickgas bei 18,5° und 770 mm Druck.

	Berechnet für $C_{12}H_{13}N_3O_3$ (Molgew. 247)	Gefunden
C	58,30	58,47
H	5,26	5,35
N	17,00	16,63

Aus Wasser kristallisiert der Körper in länglichen Stäbchen vom Schmelzp. 264° (korr. 271°).

Die Substanz ist schwer löslich in Wasser, noch schwerer in Alkohol, unlöslich in Äther, Benzol, löslich in Eisessig.

In Natronlauge löst sie sich in der Kälte nicht, beim Erhitzen tritt unter Gelbfärbung Lösung ein, und es entwickelt sich Ammoniak.

36. Emil Fischer und Karl Kautzsch: Synthese von Polypeptiden. XII. Alanyl-alanin und Derivate.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 38, 2375 (1905).
(Eingegangen am 27. Juni.)

Das Alanylalanin ist bisher im reinen Zustande nicht bekannt. Sein Ester entsteht, wie der eine von uns nachgewiesen hat, beim Erwärmen von Alaninanhydrid mit alkoholischer Salzsäure. Aber diese Verbindung ist durch geringe Neigung zur Kristallisation ausgezeichnet, und es bedurfte der Überführung in den Carbäthoxylalanylalaninester[1]), um das erste kristallisierte Derivat des Dipeptides zu erhalten.

Viel bequemer als durch Säuren läßt sich nun die Aufspaltung des Alaninanhydrides nach dem kürzlich beschriebenen[2]) allgemeinen Verfahren durch kaltes Alkali bewirken, und es ist uns ohne Schwierigkeit auf diesem Wege gelungen, das freie Dipeptid in guter Ausbeute und in schön kristallisiertem Zustande zu gewinnen. Sein Verhalten schließt sich aufs engste an das des Glycylglycins an.

Da das Alanyl-alanin zwei asymmetrische Kohlenstoffatome enthält, so müssen nach der Theorie zwei stereoisomere Racemformen existieren. Wenn aber das Alaninanhydrid, wie es den Anschein hat, ein einheitliches Produkt ist, so darf man auch erwarten, daß das daraus gebildete Dipeptid nur in einer racemischen Form resultiert. Wir haben in der Tat bisher keine Anzeichen gefunden, daß das von uns isolierte Dipeptid noch ein Gemisch von zwei Racemkörpern sei. Selbstverständlich gelten solche Resultate nur so lange, als sie nicht durch schärfere Beobachtungen berichtigt werden.

Das Alanyl-alanin läßt sich in alkalischer Lösung leicht mit α-Brompropionylbromid und α-Bromisocapronylchlorid vereinigen. Da hierdurch ein neues asymmetrisches Kohlenstoffatom eingeführt wird, so ist abermals das Auftreten von stereoisomeren Racemverbindungen zu erwarten. Dieser theoretische Schluß steht in Einklang mit der Beobachtung.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 35, 1103 [1902]. (*S. 299.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 38, 609 [1905]. (*S. 426.*)

Wir haben das Bromisocapronyl-alanyl-alanin in zwei isomeren Formen erhalten, die sich durch Schmelzpunkt und Löslichkeit unterscheiden, und die wir mit den Buchstaben A und B bezeichnen werden[1]). Ihre Trennung ist ziemlich schwierig, und wir haben noch keine volle Garantie, daß das leichtlösliche Produkt ganz rein war. Durch Ammoniak werden beide in die entsprechenden Tripeptide verwandelt, von denen aber nur die Verbindung A kristallisiert erhalten werden konnte.

Bei der Synthese des α-Brompropionyl-alanyl-alanins entstehen ebenfalls zwei Produkte, von denen wir aber nur die schwerer lösliche Form rein erhielten. Sie liefert ebenfalls bei der Behandlung mit Ammoniak ein kristallisiertes Tripeptid.

Alanyl-alanin, $NH_2.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

Über das Verhalten des Alaninanhydrides gegen verdünntes Alkali ist schon früher kurz berichtet worden[2]). Beim Schütteln mit der 8-fachen Menge Normal-Alkali löst sich die gepulverte Substanz bei gewöhnlicher Temperatur rasch auf. Nach kurzer Zeit beginnt die Abscheidung eines aus feinen Nädelchen bestehenden Natriumsalzes, das ein Derivat des Alaninanhydrids selbst zu sein scheint; denn wir erhielten dieses zurück, als wir versuchten, das Salz durch Umkristallisieren aus Alkohol zu reinigen. Zudem verschwindet das Salz, wenn man es mit derselben alkalischen Lösung, aus der es sich abgeschieden hat, weiter schüttelt, und wir vermuten, daß es hierbei auch in das Natriumsalz des Alanyl-alanins umgewandelt wird. Die Darstellung des Dipeptides gestaltet sich dementsprechend wie folgt:

25 g feingepulvertes Alaninanhydrid[3]) werden mit 200 ccm ($1^1/_8$ Mol.) *n*-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt. Im Laufe von einigen Minuten geht der größte Teil in Lösung; dann aber beginnt bald die Abscheidung des eben erwähnten Natriumsalzes, das nach etwa 10 Minuten die Flüssigkeit als dicker Brei erfüllt. Läßt man diese jetzt stehen, so löst sich die Masse langsam wieder auf, und nach etwa einer Stunde ist eine klare Flüssigkeit entstanden. Diese bleibt noch 4 bis

---

[1]) Vgl. E. Fischer, Ann. d. Chem. **340**, 123 [1905]. (*S. 464.*)

[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 38, 609 [1905]. (*S. 426.*)

[3]) Das Alaninanhydrid wurde aus dem Ester nach der früher gegebenen Vorschrift (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 434 [1901]) dargestellt. Auch für die Darstellung des Esters hat sich die alte Vorschrift bewährt; nur ist es vorteilhaft, bei größeren Mengen die mit Salzsäure behandelte alkoholische Lösung unter stark vermindertem Druck einzuengen, dann den Rückstand wieder in der gleichen Menge absoluten Alkohols zu lösen und die Sättigung mit Salzsäure zu wiederholen. Man erhält so aus 50 g Alanin 25—26 g Alaninanhydrid.

5 Stunden stehen, wird dann mit 200 ccm Normal-Salzsäure versetzt und auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft. Das Dipeptid ist zwar in Wasser recht leicht löslich, fällt aber doch, zumal bei Anwesenheit des Chlornatriums, nach genügender Konzentration aus. Man fügt dann noch in der Hitze das mehrfache Volumen 95-prozentigen Alkohol zu und filtriert nach dem Erkalten. Das so erhaltene Dipeptid enthält gewöhnlich noch Kochsalz. Da es aber in verdünntem Alkohol schwerer löslich ist als dieses, so läßt es sich davon durch Lösen in wenig warmem Wasser und Fällen mit Alkohol, besonders wenn die Operation wiederholt wird, völlig trennen. Durch die verschiedenen Kristallisationen wird selbstverständlich die Ausbeute verringert; trotzdem gelingt es, ungefähr 60% der Theorie an reinem Dipeptid zu gewinnen. In Wirklichkeit verläuft aber seine Bildung viel glatter, denn aus den späteren Angaben über die Ausbeute an den Derivaten kann man schließen, daß die Umwandlung des Anhydrides in Dipeptid sich mit mindestens 90% Ausbeute vollzieht. In der Tat läßt sich die Darstellung des Alanyl-alanins vereinfachen und die Ausbeute erhöhen, wenn man die alkalische Lösung nicht mit Salzsäure, sondern mit Jodwasserstoff neutralisiert, weil die Trennung des Dipeptides von dem in Alkohol löslichen Jodnatrium keine Schwierigkeiten macht. Über die Vorteile dieser Methode wird an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

Das Alanyl-alanin ist in Wasser, auch in der Kälte sehr leicht löslich, dagegen in absolutem Alkohol so gut wie unlöslich. Es läßt sich infolgedessen aus verdünntem Alkohol gut umkristallisieren und bildet, wenn es sich langsam abscheidet, kleine, meist stern- oder büschelartig verwachsene Nädelchen, die unter dem Mikroskop wie Spieße aussehen.

Die im Exsikkator getrocknete Substanz erleidet beim Erwärmen auf 100° keinen Gewichtsverlust.

0,1401 g Sbst.: 0,2325 g CO_2, 0,0962 g H_2O. — 0,1829 g Sbst.: 27,6 ccm N (19°, 758 mm).

$C_6H_{12}O_3N_2$. Ber. C 45,00, H 7,50, N 17,50.
Gef. „ 45,26, „ 7,63, „ 17,30.

Die wässerige Lösung reagiert schwach sauer; sie ist fast geschmacklos und löst Kupferoxyd beim Erwärmen mit tiefblauer Farbe. Das Kupfersalz ist nicht nur in Wasser sehr leicht löslich, sondern wird auch von Alkohol in nicht unbeträchtlicher Menge mit blauer Farbe aufgenommen. Die alkalische Lösung des Alanyl-alanins gibt mit Kupfersalzen eine rein blaue Farbe. Beim Erhitzen im Kapillarrohr schmilzt das Dipeptid unter schwachem Aufschäumen und unter Gelbfärbung gegen 270° (korr. 276°), also ungefähr bei derselben Temperatur wie

das Alaninanhydrid, und in der Tat haben wir uns durch einen größeren Versuch überzeugt, daß es dabei in das Anhydrid übergeht.

Suspendiert man das Peptid in absolutem Alkohol oder wasserfreiem Methylalkohol und leitet gasförmige Salzsäure ein, so wird es rasch gelöst und verestert. Die betreffenden Produkte haben aber keine große Neigung zum Kristallisieren.

Benzoyl-alanyl-alanin:

$C_6H_5.CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).COOH.$

Die Verbindung wird auf die gewöhnliche Weise durch Benzoylierung des Dipeptides in alkalischer Lösung gewonnen, wobei man am bequemsten vom Alaninanhydrid ausgeht.

5 g desselben werden in 40 ccm *n*-Natronlauge ($1^1/_8$ Mol.) und 60 ccm Wasser gelöst. Nach 6-stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur werden unter Eiskühlung innerhalb 20 Minuten in ca. 10 Portionen 5,6 g ($1^1/_8$ Mol.) Benzoylchlorid und 45 ccm *n*-Natronlauge unter heftigem Schütteln zugefügt. Setzt man jetzt einen Überschuß von Salzsäure zu, so entsteht ein weißer Niederschlag, der nach dem Abkühlen auf 0° abgesaugt, mit Wasser gewaschen, dann getrocknet, pulverisiert und zur Entfernung der Benzoësäure wiederholt mit Äther ausgekocht wird. Man erhält so 6 g Benzoyl-alanyl-alanin, das gegen 190° schmilzt. Eine weitere, aber nur kleine Menge (0,9 g) wird aus der Mutterlauge durch Einengen unter stark vermindertem Druck bei 40° gewonnen. Die Ausbeute belief sich also auf 75% der Theorie.

Zur völligen Reinigung muß die Substanz wiederholt aus heißem Wasser umgelöst werden. Sie schmilzt dann nach vorheriger Sinterung bei 199—200° (korr. 203—204°) zu einer farblosen Flüssigkeit.

0,1910 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0,4134 g CO_2, 0,1067 g H_2O. — 0,1863 g Sbst.: 17,1 ccm N (19°, 766 mm).

$C_{13}H_{16}O_4N_2$.	Ber. C 59,09,	H 6,06,	N 10,61.
	Gef. „ 59,03,	„ 6,21,	„ 10,64.

Das Benzoyl-alanyl-alanin löst sich in etwa 50 Teilen heißen Wassers; es kristallisiert daraus in farblosen, feinen Nadeln, die zum Teil büschelartig verwachsen sind. Die kalte wässerige Lösung zeigt sehr deutlich saure Reaktion.

Kupfersalz: Wird das in heißem Wasser gelöste Benzoyl-alanyl-alanin mit gefälltem Kupferoxyd gekocht, so entsteht eine schwach grün gefärbte Lösung; beim Einengen auf dem Wasserbade scheidet sich bald ein grünes Kupfersalz aus, das unter dem Mikroskop Nadeln, die zu kompakten Aggregaten verwachsen sind, erkennen läßt. Das

Salz scheint Kristallwasser zu enthalten, denn es erleidet im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure einen erheblichen Gewichtsverlust. Nachdem das Gewicht konstant geworden, gab es folgende Zahlen:

0,4124 g Sbst.: 0,0547 g CuO.

$(C_{13}H_{15}O_4N_2)_2Cu$. Ber. Cu 10,79. Gef. Cu 10,61.

Das Salz ist in Wasser sehr schwer löslich; auf Zusatz von Natronlauge entsteht eine kornblumenblaue Lösung. Von absolutem Alkohol wird es bereits in der Kälte leicht mit intensiv grüner Farbe aufgenommen.

Zur Veresterung wurde 0,3 g reine Benzoylverbindung in 2 ccm absolutem Alkohol suspendiert und die Flüssigkeit mit Salzsäuregas gesättigt, wobei Lösung stattfand. Beim Verdunsten der Flüssigkeit im Vakuum über Schwefelsäure und Natronkalk schieden sich farblose, rosettenartig verwachsene Nadeln aus, die nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser bei 114—116° (korr.) schmolzen.

Ungefähr vor Jahresfrist haben Th. Curtius[1]) und Ch. van der Linden ein Benzoyl-alanyl-alanin beschrieben, das sie aus Benzoyl-alaninazid und Alanin erhielten. Den Schmelzpunkt fanden sie bei 170—171° und den Schmelzpunkt des Esters bei 148—149°. Das Produkt ist also offenbar verschieden von dem unserigen, und es scheint sich hier um das Derivat des bisher unbekannten stereoisomeren Alanyl-alanins zu handeln, auf dessen Existenzmöglichkeit wir oben hingewiesen haben.

α-Bromisocapronyl-alanyl-alanin,

$C_4H_9.CHBr.CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

Es entsteht analog der vorhergehenden Benzoylverbindung durch Einwirkung von α-Bromisocapronylchlorid auf die Lösung des Alaninanhydrides in verdünntem Alkali.

16 g gepulvertes Alaninanhydrid werden mit 128 ccm *n*-Natronlauge und 190 ccm Wasser bis zur Lösung geschüttelt und dann die Flüssigkeit bei gewöhnlicher Temperatur einige Stunden aufbewahrt. Jetzt kühlt man sie durch Eiswasser und fügt unter heftigem Schütteln im Laufe von 20—25 Minuten 27 g Bromisocapronylchlorid ($1^1/_8$ Mol.) und 133 ccm *n*-Natronlauge in etwa 12 Portionen, und zwar Chlorid und Alkali in etwa entsprechender Menge, hinzu. Der Geruch des Chlorids verschwindet jedesmal rasch, und an seine Stelle tritt ein fruchtartiger Geruch. Zum Schluß ist die Flüssigkeit schwach ölig getrübt. Sie wird erst durch ein feuchtes Filter gegossen und dann mit 29 ccm $^5/_1$ *n*-Salzsäure angesäuert. Hierbei fällt ein dickes, farbloses Öl. Beim längeren Stehen, manchmal erst nach mehreren Tagen, erstarrt es

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 70, 148.

kristallinisch; nach Eintragen eines Kriställchens erfolgt das Festwerden schon nach einigen Stunden. Man läßt etwa 12 Stunden bei niederer Temperatur stehen, filtriert dann und wäscht mit kaltem Wasser. Die Ausbeute beträgt ungefähr 27 g. Um geringe Mengen der öligen Bromfettsäure zu entfernen, wird die Masse mit Petroläther verrieben und wieder filtriert.

Das Produkt ist ein Gemisch der beiden zuvor erwähnten Isomeren, die sich durch Schmelzpunkt und Löslichkeit ziemlich stark unterscheiden. Beim raschen Erhitzen schmilzt das eine gegen 190° unter Zersetzung und das andere zwischen 157° und 160°. Sie wurden durch fraktionierte Kristallisation aus Äthylacetat getrennt. Es bedarf aber häufiger Wiederholung der Operation, um zu Produkten von gleichbleibendem Schmelzpunkt zu gelangen. Das hochschmelzende Isomere glauben wir rein gehabt zu haben; für das niedrigschmelzende und leichter lösliche ist das nicht so sicher.

Um ein Bild von der fraktionierten Kristallisation zu geben, mögen folgende Zahlen dienen:

26 g Rohprodukt wurden in 270 ccm heißem Essigäther gelöst; nach 24 Stunden waren 4,5 g ausgefallen vom Schmp. 187—189°. Die auf 50 ccm eingedampfte Mutterlauge gab 6,4 g Kristalle vom Schmelzpunkt 170—173°; aus der Mutterlauge wurden nach dem Einengen auf die Hälfte 3,4 g vom Schmp. 150—160° und bei der vierten und fünften Fraktion noch 1,5 g vom Schmp. gegen 150° gewonnen. Mithin im ganzen 16 g aus 26 g Rohprodukt. Der Rest blieb beim völligen Verdampfen als dicke amorphe Masse zurück.

α-Bromisocapronyl-alanyl-alanin A.

Als A bezeichnen wir das schwerlösliche Isomere. Von ihm wurden durch fortgesetzte Fraktionierung 8 g aus obigen 16 g gewonnen. Es kristallisiert sowohl aus Wasser wie aus Essigäther und Aceton in farblosen, feinen Nädelchen, die häufig zu kompakten Aggregaten verwachsen sind. 1 g verlangt zur Lösung ungefähr 80 ccm heißes Wasser und 35 ccm heißen Essigäther. In heißem Alkohol und Eisessig ist es viel leichter löslich, dagegen wird es schwer von Äther und Petroläther aufgenommen. Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr erweicht es gegen 180° und schmilzt unter Zersetzung mit Braunfärbung zwischen 188 und 190° (191—193° korr.). Dieser Schmelzpunkt änderte sich dann nicht mehr beim weiteren Kristallisieren aus Essigester oder Wasser.

0,1842 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0,1035 g AgBr. — 0,1907 g Sbst.: 0,3012 g CO_2, 0,1087 g H_2O. — 0,1840 g Sbst.: 13,2 ccm N (17°, 757 mm).

$C_{12}H_{21}O_4N_2Br$. Ber. C 42,73, H 6,23, N 8,31, Br 23,74.
Gef. „ 43,07, „ 6,33, „ 8,29, „ 23,91.

α-Bromisocapronyl-alanyl-alanin B.

Die Ausbeute betrug 5,5 g. — 1 g löst sich in ungefähr 25 Teilen kochenden Wassers und in 6 ccm kochenden Essigesters. Auch in Aceton und Alkohol ist es erheblich leichter löslich, als die isomere Verbindung, dagegen ist es in Äther recht schwer und in Petroläther so gut wie gar nicht löslich. Im Kapillarrohr schmilzt die Verbindung zwischen 157 und 160° (korr. 160—163°), nachdem kurz vorher Sinterung eingetreten ist. Bei wenig höherer Temperatur treten dann Braunfärbung und Aufschäumen ein.

0,1978 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0,1110 g AgBr. — 0,1946 g Sbst.: 14,1 ccm N (18°, 756 mm).

$C_{12}H_{21}O_4N_2Br$. Ber. Br 23,74, N 8,31.
Gef. „ 23,88, „ 8,33.

Leucyl-alanyl-alanin A.

$C_4H_9.CH(NH_2).CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

Das dem schwerlöslichen Bromkörper entsprechende Tripeptid kristallisiert leicht und ist sogar in Wasser ziemlich schwer löslich, wodurch seine Isolierung sehr einfach wird.

Da die Umsetzung des Bromkörpers mit Ammoniak in der Kälte verhältnismäßig langsam vonstatten geht, so wurde er mit der 5-fachen Menge wässerigen Ammoniaks im geschlossenen Rohr 1 Stunde auf 100° erhitzt. Schon beim Eindampfen der Flüssigkeit auf dem Wasserbade schied sich dann das Tripeptid kristallinisch ab. Es wurde nach dem Erkalten filtriert und der in der Mutterlauge gebliebene Rest durch Alkohol gefällt. Die Ausbeute betrug 70% der Theorie. Zur Reinigung wurde das Tripeptid in der 40-fachen Menge heißem Wasser gelöst, dann auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt und erkalten lassen. Die Mutterlauge kann man weiter einengen oder auch mit Alkohol fällen.

Die im Exsikkator getrocknete Substanz erleidet beim Erwärmen auf 100° keinen Gewichtsverlust.

0,1895 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0,3655 g CO_2, 0,1493 H_2O. — 0,1305 g Sbst.: 17,6 ccm N (22°, 769 mm).

$C_{12}H_{23}O_4N_3$. Ber. C 52,75, H 8,43, N 15,38.
Gef. „ 52,60, „ 8,75, „ 15,46.

Im Kapillarrohr erhitzt, sintert das Tripeptid von 240° an und schmilzt gegen 260° (korr. 266°) unter schwachem Aufschäumen und Gelbfärbung. Es löst sich leicht in verdünnten Säuren und auch in Eisessig, dagegen fast gar nicht in den indifferenten organischen Lösungs-

mitteln. Die wässerige Lösung reagiert schwach sauer; mit Natronlauge und Kupfervitriol gibt sie sehr deutliche Violettfärbung. Sie löst Kupferoxyd in der Hitze mit blauer Farbe; beim Einengen auf dem Wasserbade scheidet sich ein amorphes tiefblaues Kupfersalz ab, das in absolutem Alkohol schwer löslich ist. Aus heißem Wasser kristallisiert das Tripeptid in farblosen, häufig bündelartig gelagerten Nadeln. Es ist fast geschmacklos.

Leucyl-alanyl-alanin B.

Wird das niedrigschmelzende α-Bromisocapronyl-alanyl-alanin mit der 5-fachen Menge wässerigem 25-prozentigem Ammoniak 1 Stunde auf 75° erhitzt, so ist alles Brom abgespalten. Da das Tripeptid nicht kristallisiert und deshalb die Trennung vom Bromammonium durch Fällen mit Alkohol auch nur ungenügende Resultate gab, so wurde die Lösung direkt durch Schütteln mit Silbersulfat vom Brom befreit, dann das Silber genau durch Salzsäure, die Schwefelsäure genau durch Barytwasser gefällt und die filtrierte Lösung unter stark vermindertem Druck eingeengt und schließlich im Vakuumexsikkator vollständig verdunstet. Das Tripeptid blieb dabei als gelblich gefärbte, amorphe und leicht zerreibliche Masse zurück. Es ist in Wasser sehr leicht löslich und wird durch Alkohol daraus nicht gefällt. Mit Alkali und wenig Kupfervitriol gibt es eine ins Violette spielende blaue Farbe. Alle Versuche, das Tripeptid selbst, seinen Methylester oder dessen Salze zu kristallisieren, sind ohne Erfolg geblieben, vielleicht nur deshalb, weil wir sie mit relativ kleinen Mengen anstellen mußten. Wir haben deshalb für die Analyse das Kupfersalz, allerdings auch im amorphen Zustande, benutzt. In der gewöhnlichen Weise durch Kochen der wässerigen Lösung mit Kupferoxyd dargestellt, blieb es beim Verdampfen auf dem Wasserbade als leicht lösliche, amorphe, dunkelblaue Masse zurück. Zur Reinigung wurde es in heißem, absolutem Alkohol gelöst; beim Eindampfen schied es sich etwas gallertartig ab und wurde nach dem Absaugen für die Analyse bei 100° getrocknet.

0,2588 g Sbst.: 0,0354 g CuO.

$(C_{12}H_{22}O_4N_3)_2Cu$. Ber. Cu 10,53. Gef. Cu 10,94.

α-Brompropionyl-alanyl-alanin,
$CH_3.CHBr.CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

Die Darstellung ist im wesentlichen dieselbe wie bei der Bromisocapronylverbindung. Nur ist es wegen der größeren Zersetzlichkeit des Brompropionylbromids zweckmäßig, bei sehr niederer Temperatur zu arbeiten.

14 g feingepulvertes Alaninanhydrid werden in 112 ccm *n*-Natronlauge und 168 ccm Wasser gelöst. Die Lösung bleibt 6—7 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Jetzt gibt man zu der durch Kältemischung gekühlten Flüssigkeit innerhalb 20 Minuten in kleinen Portionen abwechselnd 39,7 g α-Brompropionylbromid ($1^1/_8$ Mol.) und 123 ccm *n*-Natronlauge unter heftigem Schütteln. Dann wird mit 27 ccm $^5/_1$ *n*-Salzsäure angesäuert und die Lösung bei etwa 18 mm Druck bis auf ca. ein Viertel des Volumens eingeengt. Dabei fällt ein weißes Produkt aus, das abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen wird. Es schmilzt gegen 175—180° mit Zersetzung und besteht größtenteils aus dem hochschmelzenden α-Brompropionyl-alanyl-alanin A. Die Ausbeute beträgt 9,5 g, d. i. 33% der Theorie.

Das Produkt wurde aus etwa der 12-fachen Menge heißen Essigesters und dann mehrmals aus heißem Wasser umkristallisiert. Dabei entstehen so erhebliche Verluste, daß man zunächst nur etwa 3 g ganz reines Präparat erhält. Verarbeitet man die Mutterlaugen durch starkes Einengen, wobei die wässerigen Lösungen nur unter stark vermindertem Druck eingedampft werden dürfen, so gewinnt man noch eine erhebliche Menge des Bromkörpers, der die normale Zusammensetzung hat, aber dieses Präparat schmilzt schon gegen 165—170° und ist offenbar ein Gemisch.

0,1558 g Sbst.: 0,0991 g AgBr. — 0,1621 g Sbst.: 0,1036 g AgBr. — 0,1813 g Sbst.: 15,1 ccm N (19°, 765 mm).

$C_9H_{15}O_4N_2Br$. Ber. Br 27,12, N 9,49.
Gef. „ 27,07, 27,20, „ 9,64.

Will man aus diesem Produkt die reine Verbindung A abscheiden, so ist häufiges Umkristallisieren aus Wasser nötig und die Ausbeute wird schließlich recht gering.

Das reine α-Brompropionyl-alanyl-alanin A schmilzt im Kapillarrohr bei 198—200° (korr.) unter Braunfärbung und Aufschäumen. Es löst sich ungefähr in der 20-fachen Menge kochendem Wasser und kristallisiert beim Erkalten in feinen Nadeln. In kaltem Wasser ist es ziemlich schwer löslich. Von Essigester, Aceton und Eisessig wird es bei gewöhnlicher Temperatur nur wenig, in der Hitze aber ziemlich leicht gelöst. In Äther und Chloroform ist es schwer löslich.

0,1998 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0,1286 g AgBr. — 0,1894 g Sbst.: 0,2574 g CO_2, 0,0886 g H_2O. — 0,1842 g Sbst.: 14,5 ccm N (14°, 765 mm).

$C_9H_{15}O_4N_2Br$. Ber. C 36,61, H 5,08, N 9,49, Br 27,12.
Gef. „ 37,06, „ 5,20, „ 9,32, „ 27,39.

Wie schon die Ausbeute (33%) zeigt, ist obiges im reinen Zustande isolierte α-Brompropionyl-alanyl-alanin nicht das einzige Produkt der

Synthese. In der Tat fand sich in der wässerigen Mutterlauge, aus der die 9,5 g vom Schmp. 175—180° ausgefallen waren, ein viel leichter lösliches Produkt.

Um es zu isolieren, wurde die Lösung unter stark vermindertem Druck völlig verdampft, der Rückstand mit Essigester ausgekocht und die auf etwa 60 ccm eingeengte Essigesterlösung mit demselben Volumen Petroläther versetzt. Dabei fiel ein rötliches Öl aus, das wiederum in Essigester gelöst und von neuem mit Petroläther gefällt wurde, wobei seine Menge erheblich zurückging. Aus den Petroläthermutterlaugen schied sich beim langsamen Verdunsten eine farblose, blumenkohlartige Kristallmasse ab, die gegen 120—124° schmolz und deren Menge 9 g betrug. Durch Umkristallisieren aus warmem Wasser stieg der Schmelzpunkt auf ungefähr 129° (korr. 131°). Die über Schwefelsäure getrocknete Substanz verlor beim Erhitzen auf 100° bei 13 mm Druck nicht an Gewicht.

Wir vermuten, daß sie der Hauptmenge nach aus einem isomeren α-Brompropionyl-alanyl-alanin bestand, aber die Analyse zeigte so erhebliche Abweichung von den berechneten Werten, daß das Produkt jedenfalls sehr unrein war.

0,1210 g Sbst.: 0,1855 g CO_2, 0,0654 g H_2O. — 0,1414 g Sbst.: 0,2162 g CO_2, 0,0797 g H_2O. — 0,1743 g Sbst.: 13,0 ccm N (19°, 765 mm). — 0,1903 g Sbst.: 0,1140 g AgBr. — 0,1269 g Sbst.: 0,0760 g AgBr. — 0,1835 g Sbst.: 0,1104 g AgBr.

$C_9H_{15}O_4N_2Br$.

Ber. C 36,61, H 5,08, N 9,49, Br 27,12.

Gef. „ 41,82, 41,70, „ 6,01, 6,26, „ 8,63, „ 25,49, 25,48, 25,60.

Dialanyl-alanin,

$NH_2.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

Das hochschmelzende α-Brompropionyl-alanyl-alanin wird mit der 5-fachen Menge 25-prozentigem Ammoniak im Rohr 1 Stunde auf 75° erhitzt, dann die Lösung auf dem Wasserbade bis zum Sirup eingedampft und mit dem mehrfachen Volumen 95-prozentigem Alkohol versetzt, wobei das Tripeptid als weißes, kristallinisches Produkt ausfällt. Nach dem Erkalten wird abgesaugt und mit 95-prozentigem Alkohol ausgewaschen. Man erhält so eine halogenfreie Substanz, die gegen 215° (korr. 219°) unter Aufschäumen und Gelbfärbung schmilzt. Die Ausbeute beträgt 75% der Theorie.

Dieselbe Ausbeute ergibt sich, wenn man die nach dem Erhitzen im Rohr erhaltene Flüssigkeit zunächst vom Bromammonium in der üblichen Weise mit Silbersulfat (Fällen des Silbers mit Salzsäure und

der Schwefelsäure mit Barytwasser) befreit und die Lösung dann bei niederer Temperatur unter stark vermindertem Druck einengt.

Durch Lösen in der 6-fachen Menge heißem Wasser und Fällen mit dem 6-fachen Volumen absoluten Alkohols wird das Tripeptid umkristallisiert. Es scheidet sich in Nädelchen ab, die sternartig verwachsen sind. Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr findet gegen 215° (korr. 219°) Schäumen, Schmelzen und schwache Gelbfärbung statt, dann erstarrt die Masse wieder und gegen 250—255° (korr. 256 bis 261°) findet von neuem Schmelzung unter Gasentwickelung und Schwarzfärbung statt.

Die im Exsikkator getrocknete Substanz enthält Wasser, dessen Menge ungefähr $^1/_2$ Mol. entspricht und das sie bei 100° und 13 mm Druck verliert; nach 2-stündigem Erhitzen war Gewichtskonstanz erreicht.

0,1937 g der im Exsikkator getrockneten Substanz verloren 0,0068 g.

$C_9H_{17}O_4N_3 . ^1/_2 H_2O$. Ber. $^1/_2 H_2O$ 3,75. Gef. $^1/_2 H_2O$ 3,51.

0,1687 g Sbst. bei 100° und 13 mm Druck getrocknet: 0,2885 g CO_2, 0,1156 g H_2O. — 0,1530 g Sbst.: 24,0 ccm N (20°, 759 mm).

$C_9H_{17}O_4N_3$. Ber. C 46,75, H 7,36, N 18,18.
Gef. „ 46,64, „ 7,61, „ 17,92.

Die wasserfreie Substanz ist hygroskopisch. Beim Liegen an feuchter Luft hatte das lockere Pulver schon nach 40 Minuten 5% an Gewicht zugenommen. Nach 13 Stunden betrug die Zunahme 5,5%.

Das Dialanyl-alanin ist leicht löslich in kaltem Wasser, dagegen sehr schwer in absolutem Alkohol. Die wässerige Lösung zeigt gegen Lakmus schwach saure Reaktion; auf Zusatz von Natronlauge und wenig Kupfervitriollösung entsteht eine ins Violette spielende Blaufärbung. Das Tripeptid ist fast geschmacklos, vorübergehend tritt ein schwach süßlicher Geschmack auf.

Wird die wässerige Lösung mit gefälltem Kupferoxyd erhitzt, so entsteht eine tiefblau, violettstichig gefärbte Flüssigkeit, aus der sich beim Einengen auf dem Wasserbade das Kupfersalz als amorphe Masse abscheidet. Es löst sich sehr leicht in Wasser, ziemlich schwer dagegen in absolutem Alkohol und gar nicht in Äther.

37. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. XIII. Chloride der Aminosäuren und Polypeptide und ihre Verwendung zur Synthese.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 38, 2914 (1905).
(Eingegangen am 11. August.)

Durch Schütteln mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid lassen sich manche Aminosäuren in chlorhaltige Produkte verwandeln, die nach Zusammensetzung und Reaktionen als die salzsauren Salze ihrer Chloride von der allgemeinen Formel $R.CH(NH_3Cl).COCl$ aufzufassen sind. Speziell beschrieben wurden in der Mitteilung IX[1]) die Derivate des racemischen Alanins, der Aminobuttersäure und des Leucins. Für die letzte Verbindung wurde dann ferner gezeigt, daß sie mit Glykocollester sich leicht zum Leucylglycinester verkuppeln läßt.

Bei der weiteren Prüfung dieser vielversprechenden synthetischen Methode hat sich gezeigt, daß alle einfachen Aminosäuren unter richtig gewählten Bedingungen in die entsprechenden Chlorderivate verwandelt werden können. Genauer beschrieben sind im nachfolgenden die Derivate des Glykocolls, *d*-Alanins und des racemischen Phenylalanins. Größere Schwierigkeiten zeigten sich bei den Diamino- und Oxyaminosäuren, weil hier als Nebenprodukte wechselnde Mengen von phosphorhaltigen Substanzen entstehen. Dasselbe gilt für die Ester der Aminosäuren, deren heftige Reaktion mit Phosphorpentachlorid schon in der Mitteilung IX erwähnt ist. Ähnlich den gewöhnlichen Aminen erzeugen sie dabei komplizierte Phosphorverbindungen. Dagegen hat sich die Reaktion auf zwei Polypeptide, das Leucylglycin und das Leucyl-glycyl-glycin, anwenden lassen.

Beide liefern Derivate mit 2 Chloratomen, die ich auch als die Hydrochlorate der Chloride von der Formel:

$$C_4H_9.CH(NH_3Cl).CO.NH.CH_2.COCl$$

und

$$C_4H_9.CH(NH_3Cl).CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COCl$$

betrachte.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 38, 606 [1905]. (*S. 423.*)

Alle diese Produkte lassen sich verhältnismäßig leicht mit den Estern der Aminosäuren vereinigen; dabei entstehen zunächst Ester von höheren Polypeptiden, die durch Verseifung mit Alkali in die entsprechenden Peptide verwandelt werden können. So wurden aus den beiden zuvor erwähnten Substanzen durch Kupplung mit Leucinester bzw. Glycinester das bisher unbekannte Leucyl-glycyl-leucin, $C_4H_9.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CO.NH.CH(C_4H_9).COOH$ und das schon auf anderem Wege gewonnene Leucyl-diglycyl-glycin, $C_4H_9.CH(NH_2).CO.(NH.CH_2.CO)_2.NH.CH_2.COOH$, erhalten.

Auf dieselbe Art konnte das Phenylalanin in Phenylalanyl-glycin, $C_6H_5.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.COOH$, verwandelt werden.

Besonders gute Dienste leistet diese Methode für den Aufbau von optisch-aktiven Polypeptiden, wie die Untersuchung des *d*-Alanins gezeigt hat. Durch Kombination seines Chlorids mit dem Glykocollester entsteht das stark drehende *d*-Alanyl-glycin, das optische Isomere des früher auf anderem Wege gewonnenen *l*-Alanyl-glycins[1]). Ferner ließ sich durch Kupplung mit *d*-Alaninester das bisher unbekannte *d*-Alanyl-*d*-alanin gewinnen, dessen Untersuchung aber noch nicht abgeschlossen ist.

Salzsaures Glycylchlorid, $CH_2(NH_3Cl).COCl$.

Nachdem manche Versuche, das gewöhnliche, aus Wasser kristallisierte Glykocoll in das salzsaure Chlorid zu verwandeln, fehlgeschlagen waren, führte eine zufällige Beobachtung auf den richtigen Weg. Es ist nur nötig, das Glykocoll in wenig warmem Wasser zu lösen, dann durch einen großen Überschuß von absolutem Alkohol rasch zu fällen, das so erhaltene Präparat sorgfältig bei 100° zu trocknen, zu pulverisieren und durch ein feines Haarsieb zu treiben.

Werden 10 g der so vorbereiteten Aminosäure mit 200 ccm frischem Acetylchlorid in einer Schüttelflasche übergossen, in Eiswasser gekühlt und dann unter kräftigem Schütteln 31 g frisches und rasch gepulvertes Phosphorpentachlorid in 2 Portionen zugegeben, so verwandelt sich das feine Pulver in ein kristallinisches Produkt, das in der Flüssigkeit fein verteilt ist. Nachdem das Schütteln bei 0° etwa 20 Minuten gedauert hat, wird es auf der Maschine bei gewöhnlicher Temperatur erst eine Stunde und dann nach Zusatz von weiteren 3 g Phosphorpentachlorid noch 4 Stunden fortgesetzt. Nun filtriert man in dem früher empfohlenen Apparate[2]), wäscht zuerst mit Acetylchlorid, später mehrmals mit trocknem Petroläther und trocknet im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid.

---

[1]) E. Fischer und O. Warburg, Ann. d. Chem. **340**, 165 [1905]. (*S. 496.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 616 [1905]. (*S. 433.*)

0,1792 g Sbst.: 26,6 ccm $^1/_{10}$ $AgNO_3$. — 0,1756 g Sbst.: 26,4 ccm $^1/_{10}$ $AgNO_3$.
$C_2H_5ONCl_2$. Ber. Cl 54,6. Gef. Cl 52,7, 53,4.

Die analysierten Proben, die von verschiedenen Darstellungen herrührten, waren frei von Phosphor. Die Differenz zwischen der gefundenen und der berechneten Chlormenge zeigt, daß die Präparate nicht ganz rein waren, aber die Annäherung ist doch andererseits so groß, daß man angesichts der Analogie mit den Derivaten der anderen Aminosäuren über die Zusammensetzung des Produktes nicht zweifelhaft sein kann. Dazu kommt die Ähnlichkeit des Verhaltens. Übergießt man die Substanz mit dem mehrfachen Gewicht absoluten Alkohols, so tritt alsbald starke Erwärmung und Lösung ein, und bald nachher beginnt die Kristallisation des salzsauren Glykocollesters.

Die Ausbeute betrug 9 g, das ist nur 53% der Theorie; in der Tat geht ein erheblicher Teil des Glykocolls in ein Produkt über, das sich in Acetylchlorid löst. Es bleibt als dunkelrotes Öl zurück, wenn die Acetylchloridmutterlauge bei geringem Druck verdampft wird, und läßt sich von dem anhaftenden Phosphoroxychlorid durch Waschen mit Petroläther trennen. Auch dieses Öl löst sich unter Erwärmen in Alkohol, und bei starkem Abkühlen scheidet sich aus der Flüssigkeit salzsaurer Glykocollester ab; aber seine Menge ist verhältnismäßig gering.

Anders verläuft, wie schon erwähnt, die Wirkung des Phosphorpentachlorids auf Glykocoll, das aus Wasser kristallisiert ist.

Wird dieses nach scharfem Trocknen, Pulvern und Sieben ganz genau in der vorher angegebenen Weise mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid behandelt, so geht der größte Teil in Lösung. Der Rückstand ist ein schweres kristallinisches Pulver, dessen Menge nur 15—20% der angewandten Aminosäure beträgt, das sich nicht mit Alkohol erwärmt und dessen Chlorgehalt selbst hinter dem des salzsauren Glykocolls weit zurückbleibt.

Beim Verdampfen der Acetylchloridmutterlauge bleibt ebenfalls ein dunkelrotes Öl, das durch Waschen mit Petroläther von dem anhaftenden Phosphoroxychlorid befreit werden kann. Es löst sich in Alkohol unter lebhafter Erwärmung, und aus dieser Flüssigkeit kann man durch Abkühlen bzw. Einengen salzsauren Glykocollester isolieren; aber seine Menge entspricht nur etwa 20% des angewandten Glykocolls. Es müssen also bei der Wirkung des Phosphorpentachlorids auf das Glykocoll andere Körper in erheblicher Menge entstehen, die durch Alkohol nicht glatt in Glykocollester zurückverwandelt werden.

Bevor deren Zusammensetzung bekannt ist, scheint es mir schwierig, den merkwürdigen Unterschied zwischen dem aus Wasser kristallisierten und dem mit Alkohol gefällten Glykocoll richtig zu beurteilen. Am nächsten liegt der Gedanke, daß der Grad der Verteilung hier eine

Rolle spielt. Da aber die Pulverung und die Siebung in beiden Fällen ganz gleich war, so halte ich diese Erklärung doch nicht für ausreichend, und ich neige mehr zu der Ansicht, daß es sich um verschiedene Zustände des Glykocolls handelt, die auf Isomerie schließen lassen. Ich will jedoch diese interessante Frage nicht eingehender behandeln, bis die tatsächlichen Beobachtungen ein vollkommeneres Bild geben.

Salzsaures *d*-Alanylchlorid, $CH_3.CH(NH_3Cl).COCl$.

Für die folgenden Versuche diente reines *d*-Alanin, das aus Seide gewonnen war. Verwendet man das aus Wasser kristallisierte Präparat, so bleibt die Chlorierung auch bei höchst fein gepulvertem Material recht unvollständig, und es gelang nicht, den Chlorgehalt über 41,5% zu bringen, während für das reine salzsaure Alanylchlorid 49,24% berechnet sind. Bessere Resultate wurden durch den Kunstgriff erzielt, der beim Glykocoll erwähnt ist; dementsprechend war das *d*-Alanin aus heißer, konzentrierter, wässeriger Lösung durch absoluten Alkohol gefällt, bei 100° getrocknet, dann nochmals gepulvert und durch ein Haarsieb getrieben.

5 g des so vorbereiteten *d*-Alanins werden mit 100 ccm frisch destilliertem Acetylchlorid übergossen, auf 0° abgekühlt und dazu in 2 Portionen 14 g rasch gepulvertes, frisches Phosphorpentachlorid unter kräftigem Schütteln zugefügt. Das feine Pulver verwandelt sich dabei in eine kristallinische Masse, welche die ganze Flüssigkeit erfüllt. Das Schütteln wird zuerst bei 0° etwa 20 Minuten und dann bei gewöhnlicher Temperatur noch 3 Stunden fortgesetzt. Die Filtration und die weitere Behandlung des Produktes erfolgt ebenso wie beim Glykocoll. Die Ausbeute beträgt etwa 6 g. Das so erhaltene Präparat ist auch noch nicht ganz rein, denn der Chlorgehalt bleibt $1^1/_2$—2% unter dem berechneten, wie folgende maßanalytische Bestimmungen zeigen, bei denen das abgewogene Chlorid in kaltem Wasser gelöst und mit Silberlösung titriert wurde.

0,1780 g Sbst.: 23,75 ccm $^1/_{10}$-$AgNO_3$. — 0,4430 g Sbst.: 59,58 ccm $^1/_{10}$-$AgNO_3$.
$C_3H_7ONCl_2$. Ber. Cl 49,2. Gef. Cl 47,4, 47,8.

Behufs Prüfung, ob das Produkt noch optisch-aktiv sei, wurden 0,6366 g in ungefähr 5 ccm eiskaltem Wasser gelöst. Die Flüssigkeit wog 5,554 g, hatte das spezifische Gewicht 1,0416 und drehte bei 20° im 1-Dezimeterrohr Natriumlicht 0,75° nach rechts. Hieraus berechnet sich für das im Präparat enthaltene salzsaure Alanin $[\alpha]_D^{20^\circ}$ + 7,23°, während der Wert für reines salzsaures *d*-Alanin + 10,3° ist. Mithin waren vom *d*-Alanin durch die Überführung in das Chlorid und dessen Rückverwandlung in die Aminosäure ungefähr 30% racemisiert worden.

Nimmt man den ungünstigsten Fall an, daß bei der Zersetzung des Chlorids durch Wasser gar keine Racemisierung erfolgt, so würde das salzsaure Alanylchlorid noch 70% des optisch-aktiven Körpers enthalten. Infolgedessen ist es für die Synthese von aktiven Dipeptiden, wie im folgenden gezeigt wird, noch ein recht brauchbares Material.

Salzsaures Phenylalanylchlorid, $C_6H_5.CH_2.CH(NH_3Cl).COCl$.

Als Material diente synthetisches Phenylalanin, das aus Benzylmalonsäure gewonnen war[1]).

Übergießt man 5 g der scharf getrockneten und sorgfältig pulverisierten Aminosäure mit 100 ccm frischem Acetylchlorid, kühlt in Eiswasser und fügt dann unter Schütteln 7,5 g frisches, rasch gepulvertes Phosphorpentachlorid in 2 Portionen zu, so findet die Hauptreaktion ziemlich rasch statt, wie man an dem teilweisen Verschwinden des Phosphorpentachlorids beobachten kann. Dann aber geht der Prozeß langsam weiter und erst nach 24-stündigem Schütteln auf der Maschine war die Chlorierung vollständig. Das Produkt war dann als feines Pulver in der Flüssigkeit suspendiert. Es wurde ebenso behandelt, wie das Präparat aus Glykocoll und war nach dem Trocknen ein farbloses, lockeres Pulver. Die Ausbeute betrug 5,2 g.

0,1956 g Sbst.: 17,70 ccm $^1/_{10}$-$AgNO_3$.

$C_9H_{11}ONCl_2$. Ber. Cl 32,3. Gef. Cl 32,1.

In Alkohol löst sich die Chlorverbindung sofort unter Erwärmung und liefert dabei in großer Menge Phenylalaninester.

Salzsaures Leucyl-glycylchlorid,
$C_4H_9.CH(NH_3Cl).CO.NH.CH_2.COCl$.

Die Reaktion verläuft unter genau den gleichen Bedingungen wie bei den einfachen Aminosäuren. Selbstverständlich muß auch das Dipeptid sehr fein gepulvert sein. Angewandt wurden 5 g Leucylglycin, 100 ccm Acetylchlorid und 6 g Phosphorpentachlorid. Anfangs löst sich das Dipeptid teilweise, aber bald nachher scheidet sich das Chlorid ab, indem es die Flüssigkeit als sehr feine Masse erfüllt. Nach 2-stündigem Schütteln auf der Maschine bei gewöhnlicher Temperatur wurde der Niederschlag wie gewöhnlich filtriert, gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute ist fast quantitativ. Das Präparat enthielt aber etwas zu wenig Chlor.

0,2330 g Sbst.: 18,1 ccm $^1/_{10}$-$AgNO_3$.

$C_8H_{16}O_2N_2Cl_2$. Ber. Cl 29,2. Gef. Cl 27,6.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3064 [1904]. (*S. 372.*)

Salzsaures Leucyl-glycyl-glycylchlorid,

$C_4H_9.CH(NH_3Cl).CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COCl$.

1 g Leucyl-glycyl-glycin, das bei 100⁰ getrocknet, dann fein gepulvert, durch ein Haarsieb getrieben und abermals getrocknet war, wurde mit 20 ccm Acetylchlorid übergossen, in Eiswasser gekühlt und unter Schütteln in 2 Portionen 1,1 g Phosphorpentachlorid zugegeben. Das Pentachlorid verschwindet bei kräftigem Schütteln zum größten Teil ziemlich rasch, und in demselben Maße verwandelt sich das Tripeptid in das Chlorid, das die Flüssigkeit als lockeres Pulver erfüllt. Später aber scheint die Reaktion recht langsam zu gehen, denn selbst nach 24-stündigem Schütteln auf der Maschine bei gewöhnlicher Temperatur enthielt das Präparat, das in der gewöhnlichen Weise filtriert, gewaschen und getrocknet war, noch 2% Chlor zu wenig.

0,2854 g Sbst.: 17,45 ccm $^1/_{10}$-$AgNO_3$.

$C_{10}H_{19}O_3N_3Cl_2$. Ber. Cl 23,7. Gef. Cl 21,7.

Auch dieses Chlorid erwärmt sich mit Alkohol spontan, offenbar unter Bildung des Esters.

Verwandlung des salzsauren Phenylalanylchlorids in Phenylalanyl-glycin.

$C_6H_5.CH_2.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.COOH$.

Die Einwirkung des Chlorids auf den Glycinester vollzieht sich am besten in Chloroformlösung. Da es vorteilhaft ist, bei Ausschluß von Wasser zu arbeiten, so wird der Glycinester durch 12-stündiges Schütteln mit Baryumoxyd und das Chloroform durch Schütteln mit Phosphorsäureanhydrid getrocknet. Zu einer Mischung von 5 g Glykocollester und 50 ccm Chloroform, die durch Eis gekühlt ist, fügt man unter starkem Schütteln im Laufe von etwa 15 Minuten in mehreren Portionen 5 g rasch gepulvertes, salzsaures Phenylalanylchlorid. Dieses löst sich anfangs, und wenn das Eintragen beendet ist, beginnt bald die Abscheidung eines Kristallbreies, der nach $^1/_4$-stündigem Stehen abgesaugt und mit Chloroform gewaschen wird. Seine Menge betrug 3,9 g; er besteht zum größeren Teil aus salzsaurem Glykocollester.

Beim Verdampfen des Chloroforms unter geringem Druck bleibt ein farbloser, dicker Sirup, der zur Entfernung von überschüssigem Glykocollester mehrmals mit Äther gewaschen wird. Der Rückstand enthält die Hydrochlorate von Phenylalanyl-glycinester und Glykocollester. Er wird in 20 ccm Methylalkohol gelöst. Bleibt diese Flüssig-

keit einige Tage stehen, so scheidet sich Glycinanhydrid ab; da aber die vollständige Entfernung des Glykocollesters durch diese Verwandlung zu langsam geht, so bestimmt man in einem kleinen Teil der Lösung durch Titration den Chlorgehalt, und fügt zu der Hauptmenge in der Kälte die dem Chlor genau entsprechende Menge Natriummethylat als verdünnte methylalkoholische Lösung. Zur Abscheidung des Kochsalzes verdampft man den größten Teil des Methylalkohols unter geringem Druck, nimmt mit wenig Äthylalkohol auf, verdunstet das Filtrat wieder unter geringem Druck und wäscht den Rückstand zur Entfernung des Glykocollesters mit Petroläther. Dabei bleibt der Phenylalanyl-glycinester als Öl zurück. Da er schwer kristallisiert und auch keine schönen Salze bildet, so wurde er zur Verseifung mit 25 ccm Normal-Natronlauge bis zur Lösung kräftig geschüttelt und die Flüssigkeit nach 2-stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur mit 25 ccm Normal-Schwefelsäure versetzt. Der hierbei ausfallende amorphe Niederschlag wurde durch Erwärmen gelöst, dann die Flüssigkeit mit Tierkohle aufgekocht und das Filtrat auf dem Wasserbade eingedampft. Hierbei schied sich das Phenylalanyl-glycin schon in der Hitze kristallinisch ab. Es wurde mehrmals abfiltriert und die Mutterlauge immer weiter bis auf etwa 5 ccm konzentriert. Die Ausbeute an Rohprodukt, das frei von anorganischen Salzen war, betrug 2,75 g oder 60% der Theorie. Es wurde in ca. 50 ccm Wasser heiß gelöst, von einem geringen Rückstand filtriert und die Flüssigkeit bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft; das Dipeptid schied sich dann beim Abkühlen in kleinen, farblosen Tafeln ab, die zur Analyse bei 100° getrocknet wurden.

0,1648 g Sbst.: 0,3609 g CO_2, 0,0964 g H_2O. — 0,1593 g Sbst.: 17,7 ccm N (23°, 758 mm).

$C_{11}H_{14}O_3N_2$. Ber. C 59,46, H 6,35, N 12,64.
Gef. „ 59,72, „ 6,54, „ 12,56.

Die Substanz färbt sich im Kapillarrohr beim raschen Erhitzen von 255° an braun und schmilzt dann gegen 273° (korr.) zu einer dunkelroten Flüssigkeit.

In absolutem Alkohol ist sie recht schwer löslich; versetzt man die Lösung in heißem Wasser mit überschüssigem Alkohol, so bleibt sie anfangs klar, beim Erkalten und Reiben beginnt aber bald die Abscheidung von mikroskopischen, feinen Nadeln, die häufig zu derberen Aggregaten vereinigt sind.

Leichter als durch diese Synthese läßt sich das Phenylalanylglycin nach den Versuchen der Herren Webster und Blanck, die später beschrieben werden sollen, aus Glykocoll und α-Bromhydrozimmtsäurechlorid bereiten.

d-Alanyl-glycin.

5,8 g salzsaures *d*-Alanylchlorid wurden in eine auf 0° gekühlte Lösung von 8 g Glykocollester, der durch Baryumoxyd sorgfältig getrocknet war, in 80 ccm trocknem Chloroform in 5 Portionen eingetragen. Beim jedesmaligen kräftigen Schütteln ging das Chlorid fast völlig in Lösung. Die Mischung blieb dann bei Zimmertemperatur eine Stunde stehen, wobei manchmal Kristallisation des salzsauren Glykocollesters stattfand. Sie wurde nun ohne Filtration unter stark vermindertem Druck verdampft, der Rückstand zuerst mit Petroläther gewaschen, dann in 50 ccm Methylalkohol gelöst und in einer kleinen Menge der Flüssigkeit das Chlor maßanalytisch bestimmt. Zu dem Hauptteil der Lösung fügte man nun die für das Chlor berechnete Menge einer verdünnten Natriummethylatlösung.

Nach einstündigem Stehen bei 0° wurde das Kochsalz abfiltriert, die Flüssigkeit unter geringem Druck verdampft, und der Rückstand wieder zur Entfernung des freien Glykocollesters mit Petroläther mehrmals sorgfältig gewaschen, dann mit 5 ccm absolutem Alkohol aufgenommen und die vom Kochsalz abfiltrierte Lösung mit Äther und viel Petroläther versetzt. Hierbei schied sich ein Öl ab, das nach einstündigem Stehen von der Lösung getrennt und zur Verseifung in 40 ccm kalter Normal-Natronlauge gelöst wurde. Diese Flüssigkeit blieb $1^1/_2$ Stunden bei Zimmertemperatur stehen, wurde dann nach Zusatz von 40 ccm Normal-Schwefelsäure unter vermindertem Druck stark eingedampft und zur Fällung des Natriumsulfats mit dem 5-fachen Volumen heißem Alkohol vermischt. Die heiß filtrierte Flüssigkeit schied beim Eindampfen auf dem Wasserbade schon in der Wärme das *d*-Alanyl-glycin kristallinisch ab. Es wurde nach dem Erkalten und Zusatz von Alkohol abfiltriert. Die Ausbeute betrug 1,4 g oder 24% der Theorie, berechnet auf das angewandte salzsaure Alanyl-chlorid.

Die alkoholisch-wässerige Mutterlauge hinterließ beim völligen Eindampfen auf dem Wasserbade einen dicken Sirup, der starke Biuretfärbung zeigte, aus dem aber kein kristallisiertes Dipeptid mehr gewonnen werden konnte.

Zur Reinigung wurde das Dipeptid in wenig warmem Wasser gelöst und durch heißen Alkohol wieder abgeschieden. Für die Analyse war es bei 100° getrocknet.

0,1445 g Sbst.: 0,2161 g CO_2, 0,0892 g H_2O. — 0,1513 g Sbst.: 25,9 ccm N (23°, 758 mm).

$C_5H_{10}O_3N_2$ (Molgew. 146). Ber. C 41,10, H 6,85, N 19,18.
Gef. „ 40,79, „ 6,86, „ 19,24.

Aus Wasser scheidet sich das Dipeptid bei Zusatz von warmem Alkohol in sehr verschiedener Form ab. Manchmal sind es lange Nadeln

oder spießartige Formen, manchmal federartige Gebilde, und unter anderen Umständen wieder kompakte flächenreiche Kristalle, die vielfach zu Drusen verwachsen sind.

Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr schmilzt es unter Bräunung und Gasentwickelung gegen 235° (korr.). Es ist nahezu geschmacklos. In allen diesen Eigenschaften gleicht es durchaus dem früher beschriebenen[1]), auf ganz anderem Wege gewonnenen *l*-Alanyl-glycin; nur ist das Drehungsvermögen umgekehrt. Bei dem analysierten Präparate wurde beobachtet $[\alpha]_D^{20°}$ + 48,7°, während für die *l*-Verbindung —48,6° gefunden ist. Als aber das Präparat noch dreimal umkristallisiert war, stieg die Drehung auf + 50,2° und blieb dann konstant.

Eine Lösung von 0,3855 g Dipeptid in Wasser vom Gesamtgewicht 3,8827 g und dem spezifischen Gewicht 1,034 drehte bei 20° im 1-Dezimeterrohr 5,15° nach rechts. Daraus berechnet sich:

$$[\alpha]_D^{20°} + 50{,}2°.$$

Nach dieser Zahl dürfte auch der Wert für die spezifische Drehung der *l*-Verbindung zu korrigieren sein.

Daß man das aktive Dipeptid durch Umkristallisieren von dem Racemkörper, der zweifelsohne auch in dem Rohprodukt enthalten ist, so völlig trennen kann, ist wohl dem glücklichen Umstande zuzuschreiben, daß es einen höheren Schmelzpunkt und auch eine geringere Löslichkeit hat als jener.

Auf die gleiche Art wie das aktive Alanyl-glycin läßt sich auch das *d*-Alanyl-*d*-alanin gewinnen, wenn man an Stelle von Glycinester *d*-Alaninester verwendet. Die betreffenden Versuche sind aber noch nicht ganz abgeschlossen und sollen deshalb erst später beschrieben werden.

Neue Synthese des Leucyl-glycyl-glycinesters, $C_4H_9.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOC_2H_5$.

4 g des zuvor beschriebenen salzsauren Leucyl-glycylchlorids wurden allmählich in eine mit Eis gekühlte Lösung von 3,6 g ganz trocknem Glykocollester in 50 ccm reinem Äther eingetragen und die Mischung längere Zeit auf der Maschine geschüttelt. Der größte Teil des Reaktionsproduktes befand sich in der ungelösten Masse. Sie wurde in 40 ccm Methylalkohol gelöst, mit der für das Chlor berechneten Menge einer Natriummethylatlösung versetzt, nach Zusatz des gleichen Volumens Äther vom Kochsalz filtriert und unter geringem Druck verdampft. Es blieb ein fast farbloses Öl, das zur Entfernung des noch beigemengten Glykocollesters mit absolutem Äther tüchtig geschüttelt

[1]) Ann. d. Chem. **340**, 165 [1905]. (*S. 496.*)

wurde. Das jetzt bleibende Öl wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen, eine geringe Menge Kochsalz abfiltriert und die etwa auf ein Drittel eingedampfte Mutterlauge mit alkoholischer Salzsäure angesäuert. Auf Zusatz von wenig Äther und Abkühlen in einer Kältemischung schied sich das Hydrochlorat des Esters in mikroskopisch feinen Nadeln ab, die nach einiger Zeit abgesaugt und mit Äther gewaschen wurden. Zur Analyse war es nochmals in Alkohol gelöst, mit Äther gefällt und dann im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1540 g Sbst.: 0,2626 g CO_2, 0,1076 g H_2O. — 0,1534 g Sbst.: 5,0 ccm $^1/_{10}$-$AgNO_3$.

$C_{12}H_{23}O_4N_2.HCl$. Ber. C 46,53, H 7,73, Cl 11,47.
Gef. „ 46,50, „ 7,80, „ 11,57.

Das Salz sinterte beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 220° (korr.) und schmolz bei wenig höherer Temperatur (etwa 230°) unter Zersetzung.

Ich halte es für identisch mit dem früher beschriebenen Präparat[1]).

Die Ausbeute betrug nach obigem Verfahren nur 1,5 g. Voraussichtlich wird sie nach späteren Erfahrungen besser werden, wenn man die Wechselwirkung zwischen Chlorid und Ester in Chloroformlösung vor sich gehen läßt.

Leucyl-glycyl-leucin,

$C_4H_9.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.CO.NH.CH(C_4H_9).COOH$.

Um den Ester dieses Tripeptids zu gewinnen, trägt man 3,5 g salzsaures Leucyl-glycylchlorid, das rasch gepulvert ist, in eine Lösung von 4,8 g Leucinäthylester in 50 ccm Äther unter Eiskühlung portionsweise ein. Beim tüchtigen Schütteln löst sich das Chlorid jedesmal rasch auf und nach ca. 20 Minuten kann die Operation beendet sein. Um die Hydrochlorate zu zerlegen, fügt man zur ätherischen Lösung etwa 15 ccm Wasser und dann unter tüchtigem Schütteln allmählich Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion zu. Dabei scheidet sich aus dem Wasser vorübergehend ein dickes Öl ab, das aber von dem Äther völlig aufgenommen wird. Der ätherische Auszug wird schließlich stark konzentriert und mit viel Petroläther versetzt. Dadurch wird der Leucyl-glycyl-leucinester gefällt, während der Leucinester in Lösung bleibt. Die Ausbeute betrug 3,5 g.

Der Ester bildet ein schön kristallisierendes Nitrat. Um es zu gewinnen, löst man das Öl in ca. 30 ccm Äther und fügt 1 ccm ausgekochter starker Salpetersäure zu. Sofort beginnt dann die Ausscheidung des Nitrats, die durch Abkühlung in einer Kältemischung befördert wird. Das Salz wird nach einer halben Stunde filtriert. Die

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2991 [1903]. (*S. 335.*)

Ausbeute betrug 2,8 g oder 50% der Theorie, berechnet auf das angewandte salzsaure Leucyl-glycylchlorid.

Zur Analyse wurde das Nitrat in wenig warmem Alkohol gelöst, durch Äther gefällt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1217 g Sbst.: 0,2182 g CO_2, 0,0872 g H_2O. — 0,1579 g Sbst.: 19,9 ccm N (24°, 758 mm).

$C_{16}H_{32}O_7N_4$. Ber. C 48,93, H 8,22, N 14,3.
Gef. „ 48,90, „ 8,01, „ 14,2.

Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr beginnt das Salz gegen 147° (korr.) zu sintern und schmilzt unter Gasentwickelung gegen 160° (korr.).

Es kristallisiert aus Alkohol auf Zusatz von Äther in mikroskopisch kleinen Täfelchen und ist in Wasser sehr leicht löslich.

Will man das Tripeptid selbst gewinnen, so werden 4 g des rohen, öligen Esters mit 15 ccm Normal-Natronlauge etwa $^3/_4$ Stunden auf der Maschine geschüttelt, bis klare Lösung entstanden ist. Dann läßt man noch etwa $^1/_2$ Stunde stehen und versetzt mit 15 ccm Normal-Mineralsäure. Beim längeren Stehen (10—20 Stunden) fällt das Tripeptid kristallinisch aus. Es wird filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Die Ausbeute beträgt auch ca. 50% der Theorie, berechnet auf das angewandte salzsaure Leucyl-glycylchlorid.

Zur Reinigung wird das Tripeptid ungefähr in der 10-fachen Menge Wasser suspendiert und Ammoniak zugegeben, wobei es sich bis auf eine kleine Trübung löst. Die Flüssigkeit wird mit etwas Tierkohle aufgekocht, dann filtriert und auf dem Wasserbade verdampft, bis die Kristallisation des Tripeptids beginnt. Man läßt erkalten, filtriert die Kristalle ab und verdampft die Mutterlauge weiter. Das so gewonnene Tripeptid bildet eine kristallinische Masse von wenig charakteristischer Form.

Im Kapillarrohr rasch erhitzt, bräunt es sich gegen 245° (korr.) und schmilzt ungefähr 8° höher unter Zersetzung.

Für die Analyse war es bei 100° getrocknet.

0,1946 g Sbst.: 0,3958 g CO_2, 0,1583 g H_2O. — 0,2021 g Sbst.: 24,2 ccm N (20°, 765 mm).

$C_{14}H_{27}O_4N_3$. Ber. C 55,76, H 9,03, N 13,98.
Gef. „ 55,50, „ 9,10, „ 13,86.

Neue Darstellung von Leucyl-diglycyl-glycin[1]).

Trägt man allmählich 4,5 g salzsaures Leucyl-diglycylchlorid in eine durch Eis gekühlte Lösung von 3,3 g sorgfältig getrocknetem Glycinester in 80 ccm Chloroform ein, so geht beim Schütteln der aller-

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 38, 611 [1905]. (*S. 429.*)

größte Teil in Lösung. Ohne zu filtrieren, wird die Lösung unter geringem Druck eingedampft, wobei ein Gemisch von einem dicken Öl und einem festen Körper zurückbleibt.

Es wird zunächst mit Petroläther durchgeschüttelt, um den freien Glykocollester zu entfernen, dann der Rückstand mit 40 ccm trocknem Methylalkohol aufgenommen, von dem ungelösten Teil (ca. 1 g) filtriert und die kalte Flüssigkeit mit der für das Chlor berechneten Menge einer Natriummethylatlösung versetzt. Man verdampft nun unter geringem Druck und schüttelt den Rückstand wieder wie zuerst mit Petroläther, um den Glykocollester zu entfernen. Das Ungelöste wird mit ca. 40 ccm absolutem Alkohol in der Kälte ausgelaugt, die Lösung vom Kochsalz abfiltriert und unter geringem Druck verdampft. Als Rückstand bleibt ein schwach gelbrotes Öl, das zum größten Teil aus Leucyl-diglycyl-glycinester besteht. Zur Verseifung wird es mit 15 ccm Normal-Natronlauge bis zur Lösung geschüttelt und nach zweistündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur mit 15 ccm Normal-Schwefelsäure neutralisiert.

Zur Abscheidung des Natriumsulfates verdampft man die Lösung auf etwa 5 ccm, versetzt in der Wärme mit dem 5-fachen Volumen absolutem Alkohol und filtriert warm vom ausgefällten Sulfat. Die Mutterlauge hinterläßt beim Verdampfen auf dem Wasserbade einen anfangs öligen Rückstand, der durch mehrmaliges Abdampfen mit absolutem Alkohol fest wird.

Die Ausbeute an diesem Roh-Produkt betrug 2,35 g oder ca. 50% der Theorie, berechnet auf das angewandte Chlorid. Zur Reinigung wird das Produkt in wenig Wasser gelöst, mit Tierkohle in der Wärme entfärbt, das Filtrat wieder stark auf dem Wasserbade konzentriert und bis zur Trübung mit warmem Alkohol versetzt. Beim Erkalten scheidet sich das Tetrapeptid in schönen, feinen Nädelchen ab, die für die Analyse im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

0,1758 g Sbst.: 0,3057 g CO_2, 0,1144 g H_2O.

$C_{12}H_{22}O_5N_4$. Ber. C 47,63, H 7,32.

Gef. „ 47,42, „ 7,26.

Das Tetrapeptid verhielt sich genau so, wie das früher beschriebene Produkt, und ist zweifelsohne damit identisch. Für die praktische Darstellung ist die ältere Methode vorzuziehen.

Zum Schluß sage ich Herrn Dr. Ferd. Reuter für die wertvolle Hilfe bei obigen Versuchen besten Dank.

38. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. XIV.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 39, 453 (1906).
(Eingegangen am 27. Januar.)

Die bisher bekannten Methoden gestatten den Aufbau von Polypeptiden durch Verlängerung der Kette sowohl an der Aminogruppe wie am Carboxyl, und ich halte sie für genügend, um recht hohe Glieder dieser Klasse darzustellen. Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung des ersten Hexa- und Heptapeptids habe ich das früher beschriebene α-Bromisocapronyl-diglycyl-glycin benutzt. Durch Schütteln mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid kann es leicht in ein Chlorid verwandelt werden, das aller Wahrscheinlichkeit nach folgende Struktur hat:

$$C_4H_9.CHBr.CO(NHCH_2CO)_2.NH.CH_2CO.Cl$$

und dementsprechend α-Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid genannt werden mag.

Dies Chlorid läßt sich zwar leicht mit Glykocollester kuppeln, aber die Verseifung des hierbei entstehenden Körpers durch Alkali erfolgt so langsam, daß die Ausbeute an der entsprechenden Säure recht gering und dadurch die Synthese zu mühsam wird.

Glücklicherweise ist nun das obige Säurechlorid gegen kaltes Wasser so beständig, daß es mit Aminosäuren und auch mit Polypeptiden in alkalischer Lösung gekuppelt werden kann. Die Versuche wurden mit Glykocoll, Glycyl-glycin und Diglycyl-glycin ausgeführt und so folgende drei, bisher unbekannte Verbindungen erhalten:

$$C_4H_9.CHBr.CO(NHCH_2CO)_3.NH.CH_2.COOH,$$
$$C_4H_9.CHBr.CO(NHCH_2CO)_4.NH.CH_2.COOH,$$
$$C_4H_9.CHBr.CO(NHCH_2CO)_5.NH.CH_2.COOH.$$

Die beiden letzten wurden weiter durch Behandlung mit Ammoniak in die Peptide:

$$C_4H_9.CH(NH_2).CO.(NHCH_2CO)_4.NH.CH_2.COOH$$
Leucyltetraglycylglycin

und

$$C_4H_9.CH(NH_2).CO(NHCH_2CO)_5.NH.CH_2.COOH$$
Leucylpentaglycylglycin

übergeführt.

Ich zweifle nicht im geringsten daran, daß diese Art der Synthese noch weiter fortgesetzt werden kann und werde solche Versuche anstellen, sobald mir mehr Material zur Verfügung steht.

Die beiden Polypeptide zeigen sehr stark die Biurètfärbung, sind in Wasser spielend leicht löslich, in absolutem Alkohol aber so gut wie unlöslich. Sie sind trotz der Anwesenheit der Leucylgruppe optisch inaktiv, da sie aus racemischem Material bereitet wurden.

Größeres Interesse haben selbstverständlich die optisch aktiven Peptide wegen ihrer näheren Beziehung zu den Spaltprodukten der Proteïne, und ich halte deshalb ihre Darstellung für die nächste wichtige Aufgabe der Synthese. Im folgenden ist ein solches Dipeptid beschrieben, das aus zwei Molekülen natürlichem *d*-Alanin gewonnen wurde und dementsprechend als *d*-Alanyl-*d*-alanin bezeichnet werden kann.

Der Besitz dieser Substanz bot eine treffliche Gelegenheit, die Stereochemie der Diketopiperazine, bei denen man bisher nur in der aromatischen Reihe stereoisomere, aber optisch-inaktive Formen erhalten hat[1]), näher zu studieren. Wie am Modell leicht zu erkennen ist, kann ein Diketopiperazin von folgender Struktur

$$\mathrm{NH}\left\langle\begin{array}{l}\mathrm{CH(R)-CO}\\ \mathrm{CO-CH(R)}\end{array}\right\rangle\mathrm{NH},$$

mit zwei gleichen Substituenten R in zwei optisch-aktiven und der daraus gebildeten Racemform, und in einer optisch-inaktiven, nicht spaltbaren Form existieren. Ferner müssen die optisch-aktiven Formen die beiden Substituenten in *cis*-Stellung enthalten. Die Verhältnisse liegen also gerade umgekehrt wie bei der Hexahydrophtalsäure, wo die *trans*-Form sowohl nach der Theorie, wie nach den Versuchen von A. Werner und Conrad[2]), in optisch-aktive Komponenten gespalten werden kann.

Das eben erwähnte *d*-Alanyl-*d*-alanin läßt sich nun durch Behandlung seines Esters mit Ammoniak sehr leicht schon bei niedriger Temperatur in das entsprechende Diketopiperazin, welches ich *d*-Alaninanhydrid nenne, umwandeln. Nach der Bildungsweise muß dieses die beiden Methyle in *cis*-Stellung enthalten, und da es optisch stark aktiv ist, so wird die Folgerung der Theorie bestätigt. Dasselbe *d*-Alaninanhydrid kann aus dem Ester des *d*-Alanins durch Erhitzen auf 100°

---

[1]) C. A. Bischoff und Mitarbeiter, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **22**, 1786 [1889] und folgende Jahrg. Vgl. Zusammenstellung d. Resultate in A. Werners Lehrb. d. Stereochemie, S. 120.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 3046 [1899].

gewonnen werden. Am besten geht die Synthese mit dem Methylester, der, wie leicht begreiflich, reaktionsfähiger ist als die Äthylverbindung. Aber infolge der hohen Temperatur findet selbst bei Anwendung des Methylesters eine geringe Racemisierung statt, so daß das Endprodukt nicht ganz so rein ist, wie bei Anwendung des aktiven Dipeptids.

Da die letzte Darstellung des *d*-Alaninanhydrids recht bequem ist, so hatte ich gehofft, durch Aufspaltung mit Alkali daraus das interessante *d*-Alanyl-*d*-alanin leichter gewinnen zu können. Diese Erwartung hat sich leider nicht erfüllt, denn bei der Rückverwandlung des Anhydrids in das Dipeptid durch kalte, verdünnte Natronlauge wird ein sehr erheblicher Teil inaktiv.

Das früher beschriebene inaktive Alanylalanin[1]) ist wahrscheinlich die Racemform des obigen aktiven Dipeptids, denn es wird nach den Beobachtungen von Abderhalden und mir[2]) durch Pankreassaft partiell hydrolysiert, und alle bisherigen Erfahrungen deuten darauf hin, daß das Ferment nur bei denjenigen Dipeptiden angreift, welche die in der Natur vorkommenden aktiven Aminosäuren, im vorliegenden Falle also *d*-Alanin, enthalten.

Mit der Synthese des optisch-inaktiven, aber nicht spaltbaren Alaninanhydrids aus *l*-Alanyl-*d*-alanin ist zurzeit Herr Dr. Raske beschäftigt.

Für alle diese Versuche waren größere Mengen von *d*-Alanin nötig. Es wird am leichtesten aus der Seide in der nachfolgend beschriebenen Weise dargestellt, und ich habe den Besitz größerer Mengen benutzt, um es völlig zu reinigen und seine Eigenschaften, insbesondere sein optisches Verhalten, sorgfältiger zu bestimmen.

Wie oben erwähnt, ist der Methylester des Alanins mehr zur Abspaltung von Alkohol und Bildung des Anhydrids geeignet als die Äthylverbindung. Die gleiche Erfahrung machten Herr U. Suzuki und ich bei den Estern der Diamino- und Oxyaminosäuren[3]). Ich zweifle deshalb nicht daran, daß für die meisten Kondensationen der Aminosäuren die Methylester brauchbarer sind, und ich beabsichtige, von dieser Erkenntnis mannigfache Nutzanwendung zu machen. Ein neues Beispiel dafür kann ich schon heute anführen.

Wie früher mitgeteilt wurde[4]), verwandelt sich der Äthylester des Diglycylglycins bei mehrstündigem Erhitzen auf 110° in komplizierte Stoffe, welche Biuretreaktion geben und wahrscheinlich zum Teil aus höheren Peptiden bestehen. Leider war ihre Reinigung ziemlich

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 3775 [1905]. (*S. 528.*)

[2]) Zeitschr. für physiol. Chem. **46**, 52. (*S. 595.*)

[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 4173 [1905]. (*S. 438.*)

[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2501 [1904]. (*S. 352.*)

mühsam und verlangte soviel Material, daß ich ihre ausführliche Untersuchung verschieben mußte.

Viel leichter und glatter findet nun dieser Vorgang beim Methylester statt, und es bilden sich zwei Kondensationsprodukte. An Menge überwiegend ist der in heißem Wasser leicht lösliche, alkalisch reagierende Methylester des Pentaglycylglycins, dessen Bildung der Gleichung entspricht:

$$2\,NH_2.CH_2.CO.(NHCH_2CO).NH.CH_2.CO_2CH_3$$
$$= NH_2.CH_2.CO.(NHCH_2CO)_4.NH.CH_2.CO_2CH_3 + CH_4O.$$

Die Annahme, daß die sechs Glycinreste in gerader Kette verbunden sind, ist zwar sehr wahrscheinlich, aber doch nicht streng bewiesen. Ich will sie deshalb später durch eine andere Synthese der Substanz prüfen.

Aus dem Ester läßt sich durch Verseifung mit Alkali leicht das Pentaglycylglycin gewinnen. Der andere Körper ist amorph und in Wasser fast unlöslich, aber leicht löslich in konzentrierter Salzsäure. Er scheint mir einem Körper zu entsprechen, den Th. Curtius[1]) vor zwei Jahren als Kondensationsprodukt des Triglycylglycinäthylesters (Biuretbase) ganz kurz beschrieben hat und für Octoglycinanhydrid, $(NHCH_2CO)_8$, zu betrachten geneigt ist.

α-Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid, $C_4H_9.CHBr.CO.(NHCH_2CO)_2.NH.CH_2.CO.Cl$.

Übereinstimmend mit den Erfahrungen beim Glykocoll und einigen anderen Aminosäuren ist die Beobachtung, daß die Chlorierung des Bromisocapronyl-diglycyl-glycins, wenn es aus Wasser umkristallisiert wurde, sehr schwer ist. Ungleich besser sind die Resultate bei dem aus heißem Alkohol kristallisierten Präparat, aber auch hier ist längeres Aufbewahren oder Trocknen bei höherer Temperatur nachteilig. Diese Erfahrungen deuten meines Erachtens gerade so wie bei den Aminosäuren auf das Bestehen einer neuen Isomerie hin, die noch der näheren Aufklärung bedarf. Das Bromisocapronyl-diglycyl-glycin wird deshalb aus heißem Alkohol kristallisiert, filtriert, mit Äther gewaschen, dann 2 Stunden im Vakuum bei 50° getrocknet, jetzt fein gepulvert, durch ein Haarsieb getrieben und sofort für die Chlorierung benutzt.

5 g dieses Materials werden mit 50 ccm frisch destilliertem Acetylchlorid in einer Schüttelflasche übergossen, in Eiswasser abgekühlt und 3,15 g frisches und rasch gepulvertes Phosphorpentachlorid in 2 Portionen unter kräftigem Umschütteln zugegeben. Das Pentachlorid ver-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 1300 [1904].

schwindet rasch, und das Bromisocapronyl-diglycyl-glycin verwandelt sich ohne bemerkenswerte Erscheinung in das Chlorid. Zur Vollendung der Reaktion schüttelt man noch eine halbe Stunde auf der Maschine bei Zimmertemperatur. Jetzt wird das als farbloses Pulver in der Flüssigkeit suspendierte Chlorid in dem früher beschriebenen Apparate[1]) bei sorgfältigem Ausschluß von Feuchtigkeit filtriert, erst mit Acetylchlorid, dann zweimal mit trocknem Petroläther gewaschen und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentachlorid 1—2 Stunden getrocknet.

0,2703 g Sbst.: 6,2 ccm $^1/_{10}$ n-$AgNO_3$.

$C_{12}H_{19}N_3O_4BrCl$. (Mol. 384,7.) Ber. Cl 9,2. Gef. Cl 8,14.

Wie die Analyse zeigt, ist der Chlorgehalt um 1% zu gering, woran der unvollständige Verlauf der Reaktion oder auch die etwas schwierige Nachbehandlung des Präparates Schuld sein kann.

Die Ausbeute beträgt etwa 85% der Theorie. Das Chlorid ist recht empfindlich gegen Wasser; in Alkohol löst es sich unter deutlicher Erwärmung spielend leicht.

α-Bromisocapronyl-triglycyl-glycinester,
$C_4H_9.CHBr.CO.(NHCH_2CO)_3.NH.CH_2.COOC_2H_5$.

In eine durch Eis gut gekühlte Mischung von 1,6 g reinem, scharf getrocknetem Glykocollester und 50 ccm trocknem Chloroform trägt man allmählich (in etwa 5 Portionen) unter kräftigem Schütteln im Laufe von etwa 20 Minuten 2,4 g frisch bereitetes Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid ein. Dies geht ziemlich rasch in Lösung. Findet während der Operation die Bildung eines Niederschlages statt, so fügt man noch Chloroform (etwa 20 ccm) hinzu. Schließlich wird die fast klare Lösung unter vermindertem Druck eingedampft und der farblose, kristallinische Rückstand zur Entfernung von Glykocollesterchlorhydrat und etwa vorhandenem Bromisocapronyl-diglycyl-glycin zuerst mit ca. 30 ccm kaltem Wasser und dann nochmals mit etwa 20 ccm Wasser unter Zusatz von wenig Ammoniak ausgelaugt. Der Rückstand ist fast reiner Bromisocapronyl-triglycyl-glycinester, und die Ausbeute beträgt bei guter Qualität des Chlorides fast 90% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wird er in der 20-fachen Menge heißem Eisessig gelöst, mit etwas Tierkohle entfärbt, und die Lösung in der Hitze mit dem 3-fachen Volumen heißem Wasser vermischt. Beim Erkalten scheidet sich der Ester als farbloses, kristallinisches Pulver ab, das unter dem Mikroskop aus knollenartigen Aggregaten von äußerst feinen Nädelchen erscheint.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 38, 616 [1905]. (*S. 433.*)

Für die Analyse wurde bei 100° getrocknet.

0,1887 g Sbst.: 0,2939 g CO_2, 0,1039 g H_2O. — 0,1885 g Sbst.: 20,3 ccm N (19°, 758 mm).

$C_{16}H_{27}O_6N_4Br$. (Mol. 451,35.) Ber. C 42,54, H 6,03, N 12,45.
Gef. „ 42,48, „ 6,16, „ 12,40.

Im Kapillarrohr rasch erhitzt, beginnt der Ester gegen 235° (korr.) braun zu werden und schmilzt gegen 241° (korr.) unter Gasentwickelung. Er ist in heißem Wasser, Alkohol und Essigester recht schwer löslich.

Von verdünntem Alkali wird der Ester bei gewöhnlicher Temperatur sehr langsam angegriffen, und selbst im Brutraum ist 4—5-stündiges Schütteln der sehr fein gepulverten Substanz mit der für 1,5 Moleküle berechneten Menge $^1/_3$ *n*-Natronlauge nötig, um alles in Lösung überzuführen. Beim Ansäuern und längeren Stehen in der Kälte erhält man eine kristallinische Säure, wahrscheinlich Bromisocapronyl-triglycyl-glycin, aber die Ausbeute betrug noch nicht ein Drittel der Theorie. Voraussichtlich würde die Verseifung bei dem Methylester leichter gehen. Ich habe den Versuch aber unterlassen, weil die Säure sich viel bequemer direkt aus dem Glykocoll darstellen läßt.

α-Bromisocapronyl-triglycyl-glycin,
$C_4H_9.CHBr.CO.(NHCH_2CO)_3.NH.CH_2.COOH$.

1 g Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid (1 Mol.) wird in mehreren Portionen unter kräftigem Schütteln in eine Lösung von 0,4 g Glykocoll (2 Mol.) in 5 ccm *n*-Natronlauge, die bis zum Gefrieren abgekühlt ist, eingetragen. Während dieser Operation fügt man noch 2 ccm *n*-Natronlauge zu. Das Chlorid verschwindet verhältnismäßig langsam, so daß der Vorgang ungefähr 15 Minuten beansprucht. Zum Schluß wird von einem geringen Rückstand filtriert, und die klare Flüssigkeit mit 6 ccm *n*-Salzsäure versetzt. Nach kurzer Zeit beginnt die Abscheidung von Kristallen, welche schließlich die Flüssigkeit breiartig erfüllen. Sie werden nach 1-stündigem Stehen in Eiswasser filtriert, auf porösem Ton von der Mutterlauge befreit und aus ca. 30 ccm heißem Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 0,8 g oder 73% der Theorie. In der obigen Vorschrift ist die Menge des Glykocolls doppelt so groß genommen, als die Theorie verlangt, um das viel wertvollere Chlorid möglichst auszunutzen. Das gleiche gilt für die beiden folgenden Kupplungen.

Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet.

0,1851 g Sbst.: 21,4 ccm N (20°, 749 mm). — 0,2043 g Sbst.: 0,0902 g AgBr.

$C_{14}H_{23}O_6N_4Br$ (Mol. 423,3). Ber. N 13,26, Br 18,89.
Gef. „ 13,10, „ 18,79.

Aus Wasser kristallisiert die Säure in mikroskopisch kleinen, ziemlich derben Plättchen, die beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 212° (korr.) sich braun färben und gegen 218° (korr.) unter Zersetzung schmelzen.

Durch Einwirkung von Ammoniak wird man daraus zweifellos das entsprechende Pentapeptid erhalten.

α-Bromisocapronyl-tetraglycyl-glycin, $C_4H_9.CHBr.CO.(NHCH_2CO)_4.NH.CH_2.COOH$.

An Stelle des Glycyl-glycins verwendet man als Ausgangsmaterial bequemer das Glycinanhydrid.

1,2 g desselben (entsprechend 2 Mol. Glycyl-glycin) werden in 12 ccm *n*-Natronlauge durch Schütteln gelöst und 25 Minuten bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen, so daß die Umwandlung in das Dipeptid sicher vollendet ist. Jetzt fügt man zur Neutralisation des überschüssigen Alkalis 1,4 ccm *n*-Salzsäure zu, kühlt die Flüssigkeit in einer Kältemischung bis zur Eisbildung ab, und trägt dann unter kräftigem Schütteln und weiterem Kühlen 2 g Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid im Laufe von einer halben Stunde portionenweise ein. Wenn ungefähr die Hälfte des Chlorids verbraucht ist, fügt man noch 3 ccm *n*-Alkali und zum Schluß der Operation noch 1 ccm zu. Das Chlorid geht auch hier ziemlich langsam in Lösung. Wenn es bis auf einen geringen Rest verschwunden ist, wird die Flüssigkeit, die ziemlich stark schäumt, filtriert und mit 9,2 ccm *n*-Salzsäure versetzt. Dabei findet sofort die Abscheidung des Kupplungsproduktes statt. Es wird nach einstündigem Stehen bei 0° abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und aus ca. 100 ccm heißem Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute an reinem Präparat ist gleich der Menge des angewandten Chlorids, was 80% der Theorie entspricht.

Für die Analyse wurde bei 100° getrocknet.

0,1393 g Sbst.: 17,9 ccm N (18°, 748 mm). — 0,1800 g Sbst.: 0,0700 g AgBr.

$C_{16}H_{26}O_7N_5Br$ (Mol. 480,36). Ber. N 14,61, Br 16,65.
Gef. „ 14,65, „ 16,55.

Die Substanz bildet ein kristallinisches Pulver, das unter dem Mikroskop aus ziemlich derben Aggregaten von wenig charakteristischer Form erscheint. Rasch erhitzt, beginnt sie gegen 230° (korr.) braun zu werden und schmilzt gegen 237° (korr.) unter Gasentwickelung. Von heißem Wasser braucht sie die 40—50-fache Menge zur Lösung, in heißem Eisessig ist sie etwas leichter löslich und scheidet sich daraus beim Abkühlen in kugeligen Aggregaten aus. Von heißem Alkohol wird sie so schwer aufgenommen, daß man für 1 g fast 2 L anwenden muß.

Leucyl-tetraglycyl-glycin,
$C_4H_9.CH(NH_2).CO.(NHCH_2CO)_4.NH.CH_2.COOH$.

Übergießt man 1,5 g Bromisocapronyl-tetraglycyl-glycin mit 15 ccm wässerigem Ammoniak, das bei 0° gesättigt ist, so findet beim Umschütteln ziemlich rasch Lösung statt, und nach 2-tägigem Stehen der Flüssigkeit bei Zimmertemperatur ist die Abspaltung des Halogens vollzogen. Man filtriert dann die etwas trübe Lösung und verdampft sie zuerst unter vermindertem Druck. Da hierbei aber nach einiger Zeit sehr starkes Schäumen eintritt, so wird der Rest auf dem Wasserbade eingedampft. Der hierbei hinterbleibende, schwach gelbe Sirup verwandelt sich beim nochmaligen Abdampfen mit Alkohol in eine feste Masse. Er wird zunächst in etwa 3 ccm Wasser gelöst und diese Flüssigkeit in der Hitze mit ziemlich viel warmem Alkohol versetzt. Beim Erkalten scheidet sich das Hexapeptid als farbloses Pulver aus. Die Ausbeute betrug 0,8 g oder 62% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wird es in 15 ccm alkoholischem Ammoniak warm gelöst. Beim Wegkochen des Ammoniaks scheidet es sich als weißes Pulver aus, das makroskopisch ein kristallinisches Ansehen hat, unter dem Mikroskop aber als kugelige Aggregate erscheint, bei denen man keine deutliche Kristallform entdeckt.

Zur Analyse wurde bei 100° im Vakuum getrocknet.

0,1240 g Sbst.: 0,2095 g CO_2, 0,0756 g H_2O. — 0,2042 g Sbst.: 34,2 ccm N (15°, 769 mm).

$C_{16}H_{28}O_7N_6$ (Mol. 416,46).	Ber. C 46,1,	H 6,77,	N 20,23.
	Gef. „ 46,1,	„ 6,80,	„ 19,90.

Die Substanz färbt sich beim raschen Erhitzen von 225° (korr.) an und schmilzt partiell unter starkem Schäumen gegen 240° (korr.). In Wasser ist sie sehr leicht, in absolutem Alkohol aber sehr schwer löslich. Sie zeigt sehr starke Biuretfärbung.

α-Bromisocapronyl-pentaglycyl-glycin,
$C_4H_9.CHBr.CO.(NHCH_2CO)_5.NH.CH_2.COOH$.

2,4 g α-Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid (1 Mol.) wurden ebenso wie in den vorhergehenden Fällen in eine Lösung von 2,3 g Diglycyl-glycin (2 Mol.) in 12 ccm *n*-Natronlauge allmählich eingetragen und während der Operation noch 4 ccm *n*-Natronlauge zugegeben. Die alkalische Flüssigkeit schäumt sehr stark wie Seifenlösung, so daß das Verschwinden des Chlorids schwerer zu beobachten ist. Nach ungefähr einhalbstündigem Schütteln wird die alkalische Lösung filtriert und mit 4 ccm 5-fach *n*-Salzsäure versetzt, wobei sofort ein dicker Nieder-

schlag entsteht. Er wird nach einstündigem Stehen in Eiswasser soweit wie möglich abgesaugt, durch Aufstreichen auf eine Tonplatte von der Mutterlauge befreit, dann in etwa 300 ccm heißem Wasser gelöst, und die Flüssigkeit mit Tierkohle entfärbt und geklärt. Aus dem heißen Filtrat scheidet sich beim Abkühlen auf 0° schon ein Teil des Kupplungsproduktes (etwa 1 g) aus. Den Rest gewinnt man durch Eindampfen der Mutterlauge unter geringem Druck. Die Gesamtausbeute betrug 2,5 g oder 73% der Theorie.

Für die Analyse wurde im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1864 g Sbst.: 0,2707 g CO_2, 0,0888 g H_2O. — 0,1643 g Sbst.: 22 ccm N (19,5°, 766,5 mm). — 0,1654 g Sbst.: 0,0587 g AgBr.

$C_{18}H_{29}O_8N_6Br$ (Mol. 537,43). Ber C 40,19, H 5,44, N 15,67, Br 14,88.
Gef. „ 39,60, „ 5,33, „ 15,57, „ 15,10.

Die Menge des gefundenen Kohlenstoffs weicht allerdings 0,6% von der Theorie ab, was vielleicht von der schweren Verbrennbarkeit der Substanz herrührt.

Aus Wasser scheidet sich die Verbindung in farblosen, knolligen Aggregaten ab, die unter dem Mikroskop ganz gleichmäßig aussehen, aber keine deutliche kristallinische Struktur zeigen. Rasch erhitzt, beginnt sie gegen 220° (korr.) sich zu färben und schmilzt unter totaler Zersetzung gegen 250° (korr.). In Alkohol und Eisessig ist sie schwer löslich.

Leucyl-pentaglycyl-glycin,

$C_4H_9.CH(NH_2).CO.(NHCH_2CO)_5.NH.CH_2.COOH$.

2,5 g des vorhergehenden Bromkörpers wurden in 13 ccm wässerigem, bei 0° gesättigtem Ammoniak gelöst und mehrere Tage stehen gelassen. Dabei war ein kleiner Niederschlag entstanden, der sich auf Zusatz von Wasser löste. Die Isolierung des Heptapeptids wurde genau so ausgeführt, wie die des Hexapeptids, nur wurde es zur völligen Reinigung nicht in alkoholischem Ammoniak gelöst, sondern aus der wässerigen Lösung durch Alkohol gefällt. Man gewinnt es auf diese Art ebenfalls als farbloses, körniges Pulver, das aus mikroskopisch kleinen, kugeligen Aggregaten ohne deutliches, kristallinisches Gefüge besteht.

Für die Analyse wurde ebenfalls im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1656 g Sbst.: 0,2739 g CO_2, 0,1012 g H_2O. — 0,1062 g Sbst.: 19,3 ccm N (19°, 764 mm).

$C_{18}H_{31}O_8N_7$ (Mol. 473,52). Ber. C 45,62, H 6,6, N 20,70.
Gef. „ 45,11, „ 6,8, „ 21,02.

Das Heptapeptid färbt sich ebenfalls beim raschen Erhitzen von ca. 220° gelb, später braun und zersetzt sich gegen 270° vollständig.

Es zeigt sehr stark die Biuretfarbe, löst sich in Wasser leicht und in absolutem Alkohol äußerst schwer.

Für die Darstellung seiner Derivate, unter denen man zweifelsohne auch kristallinischen Produkten begegnen wird, fehlte mir bisher das Material.

Darstellung des *d*-Alanins aus Seide.

Als Rohmaterial benutzt man am besten die billigen Abfälle der Mailänder Grège.

1 kg wird mit 4 L Salzsäure übergossen und öfter umgeschüttelt, bis nach etwa einer Stunde die Fäden zerfallen sind. Dann erwärmt man wiederum unter häufigem Umschütteln langsam auf dem Dampfbade, wobei unter starkem Schäumen durch die entweichende Salzsäure eine dunkelviolette Lösung entsteht. Diese wird endlich am Rückflußkühler 5 Stunden gekocht, wobei es vorteilhaft ist, 1—2 Löffel Tierkohle zuzusetzen. Nach völligem Erkalten filtriert man die salzsaure Flüssigkeit durch grobes aber starkes Koliertuch und verdampft dann unter stark vermindertem Druck bei 40—45° bis zum dicken Sirup. Dieser wird noch warm mit 3 L absolutem Alkohol übergossen und ein sehr kräftiger Strom von trockner Salzsäure ohne Kühlung unter öfterem Umschütteln bis zur Sättigung eingeleitet, wobei wiederum vollständige Lösung und die Erhitzung des Alkohols bis zum Sieden stattfinden muß. Diese Operation soll in $1^1/_2$ Stunden beendet sein. War der Salzsäurestrom und infolgedessen die Erhitzung zu schwach, so muß nachträglich noch auf dem Wasserbade etwa eine halbe Stunde im Sieden erhalten werden, um die Veresterung möglichst vollständig zu machen. Wird jetzt die tief dunkelbraune Flüssigkeit bei 0° abgekühlt und mit einigen Kriställchen von salzsaurem Glykocollester geimpft, so scheidet sich im Laufe von 12 Stunden bei 0° der größte Teil des Glykocolls als Esterchlorhydrat in Form eines dicken Kristallbreies ab. Man filtriert die Masse auf der Nutsche über grobem Koliertuch, preßt stark zusammen und wäscht mit wenig eiskaltem Alkohol. Die salzsaure, alkoholische Lösung wird wiederum unter geringem Druck, aus einem Bade von 40—45° möglichst stark eingedampft und der zurückbleibende Sirup von neuem mit $1^1/_2$ L Alkohol durch Salzsäuregas verestert. Läßt man dann die erkaltete Lösung nach dem Impfen noch 2 Tage bei 0° stehen, so scheidet sich auch der Rest des Glykocolls als Esterchlorhydrat größtenteils ab. Die abermals filtrirte Lösung wird wiederum unter geringem Druck verdampft und daraus in der häufig beschriebenen Weise durch Alkali und Kaliumcarbonat die Ester

in Freiheit gesetzt und mit Äther extrahiert, wovon etwa 6 L erforderlich sind. Nachdem der größte Teil des Äthers bei gewöhnlichem Druck auf dem Wasserbade verdampft ist, wird die Destillation unter einem Druck von 10—12 mm fortgesetzt. Bei gewöhnlicher Temperatur geht zunächst noch Äther weg. Erwärmt man dann das Siedegefäß in warmem Wasser, so kommt zuerst ein Vorlauf, der noch Alkohol, Äther, aber auch schon etwas Glykocoll- und Alaninester enthält. Ist die Badtemperatur auf 55° gestiegen, so fängt die Hauptmenge des Alaninesters an zu sieden. Man unterbricht die Operation, wenn bei einer Badtemperatur von 80° nichts mehr übergeht. Auf diese Weise erhält man 220—250 g Destillat, das zum allergrößten Teil aus Alaninester besteht. Der Rückstand kann auf Serin verarbeitet werden.

Zur Gewinnung des freien Alanins wird der Alaninester mit der 5-fachen Menge Wasser etwa 4—5 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, bis die alkalische Reaktion verschwunden ist. Man verdampft dann die Lösung auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation. Läßt man jetzt die Flüssigkeit bei 0° stehen, so scheiden sich etwa 60 g Alanin ab, die nach der optischen Bestimmung fast reine *d*-Verbindung sind. Als zweite Kristallisation werden aus der Mutterlauge 40—50 g erhalten, die auch noch ziemlich reine, aktive Aminosäure sind, so daß die Gesamtausbeute 100—110 g beträgt. Die letzten Mutterlaugen enthalten noch ziemlich viel aktives Alanin, aber verunreinigt durch soviel Racemkörper, daß sie durch bloße Kristallisation aus Wasser nicht mehr davon getrennt werden können. Die beiden ersten Kristallisationen werden noch einmal in heißem Wasser gelöst und die Flüssigkeit bis zur beginnenden Kristallisation auf dem Wasserbade eindampft. Bei 0° scheidet sich dann eine große Menge der reinen, aktiven Aminosäure ab.

Eigenschaften des reinen *d*-Alanins. Beim langsamen Verdunsten der wässerigen Lösung bei gewöhnlicher Temperatur scheidet sich die Substanz in prächtig ausgebildeten, manchmal zentimetergroßen, dicken und flächenreichen Kristallen ab. Auf Vermittlung meines Kollegen, Geheimrats C. Klein, hat Herr Dr. F. von Wolff, Privatdozent der Mineralogie an hiesiger Universität, ihre Untersuchung gütigst übernommen, und ich verdanke ihm folgende Angaben:

Kristallsystem: rhombisch, auf Grund von Ätzfiguren sphenoïdisch-hemiëdrisch; Achsenverhältnis: $\breve{a}:\bar{b}:\acute{c} = 0{,}9784:1:0{,}4924$. Beobachtete Formen: ∞P (110); $P \breve{\infty}$ (011); $\infty P \bar{\infty}$ (100); $\infty P \breve{\infty}$ (010); Ebene der optischen Achsen: $\infty P \bar{\infty}$ (100). Die erste negative Mittellinie steht auf $\infty P \breve{\infty}$ (010) senkrecht.

Das reine *d*-Alanin schmeckt ziemlich stark süß, hat aber, wenn es in fein gepulverter Form geprüft wird, einen schwach faden Nach-

geschmack. Genau so verhält sich übrigens auch das *l*-Alanin, so daß eine Geschmacksverschiedenheit bei diesen beiden Isomeren nicht besteht. Da das Drehungsvermögen der reinen Aminosäure in Wasser sehr gering ist, so benutzt man für die optische Untersuchung am besten das Hydrochlorat. Ich habe diese Bestimmung früher bei den beiden Isomeren ausgeführt und $[\alpha]_D^{20}$ im einen Falle $+9,55^0$, im anderen $-9,68^0$ gefunden. Diese Zahlen sind aber etwas zu gering, und den Präparaten war offenbar etwas Racemkörper beigemischt, denn sie wurden durch Spaltung der Benzoylverbindungen mit Salzsäure dargestellt, und hierbei findet eine partielle Racemisierung statt. Dieser Racemkörper wird beim Umkristallisieren des salzsauren Salzes aber nicht entfernt. Dagegen findet dieses offenbar statt beim Umkristallisieren der freien Aminosäure aus Wasser.

Ein Präparat, welches aus dem durch wiederholte Kristallisation aus Wasser sorgfältig gereinigten *d*-Alanin durch Abdampfen mit einem geringen Überschuß von Salzsäure, Lösen des Rückstandes in Alkohol und Fällen mit Äther dargestellt war, gab folgende Zahlen:

Eine Lösung vom Gesamtgewicht 3,6173 g, die 0,3662 g salzsaures Alanin enthielt, drehte Natriumlicht bei 20^0 im 1-Dezimeterrohr $1,07^0 \pm 0,02^0$ nach rechts und hatte das spez. Gewicht 1,03. Daraus berechnet sich:

$$[\alpha]_D^{20} = +10,3^0 \pm 0,2^0.$$

Bei einem zweiten Versuch wurde die Aminosäure in Wasser und der berechneten Menge Salzsäure gelöst.

Die Lösung, deren Gesamtgewicht 6,2513 g betrug und die 0,4452 g Alanin, also 10,04% salzsaures Alanin, enthielt, drehte Natriumlicht bei 20^0 im 1-Dezimeterrohr $1,08^0 \pm 0,02^0$ nach rechts und hatte das spez. Gewicht 1,033. Daraus:

$$[\alpha]_D^{20} = +10,4^0 \pm 0,2^0.$$

Ein mäßiger Überschuß von Salzsäure verändert die spezifische Drehung kaum.

Zum Vergleich wurde jetzt *l*-Alanin aus dem synthetischen Racemkörper in der früher beschriebenen Weise mittels der Benzoylverbindung dargestellt und auch hier die aktive Aminosäure durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Wasser zuvor gereinigt. Die optische Bestimmung gab dann unter denselben Bedingungen für das Hydrochlorat den Wert $[\alpha]_D^{20^0} = -10,3^0$.

Eine Lösung vom Gesamtgewicht 7,1412 g, die 0,5010 g *l*-Alanin enthielt, drehte Natriumlicht bei 20^0 im 2-Dezimeterrohr $2,10^0 \pm 0,02^0$ nach links und hatte das spez. Gewicht 1,032. Daraus:

$$[\alpha]_D^{20^0} = -10,3^0 \pm 0,1^0.$$

Man kann demnach für das salzsaure aktive Alanin in ungefähr 10-proz. wässeriger Lösung als Mittelwert annehmen $[\alpha]_D^{20} = +10{,}3^0$. Es ist aber zu beachten, daß dieser Wert nur erreicht wird, wenn die freie Aminosäure aus Wasser sehr sorgfältig umkristallisiert ist. Bei den Präparaten, wie sie bei der Hydrolyse der Proteïnstoffe nach dem üblichen Verfahren gewonnen werden, bleibt die optische Drehung in der Regel 1—2^0 unter diesem Werte, weil bei dem Kochen mit Säuren stets eine partielle Racemisierung der Aminosäuren stattfindet.

d-Alanyl-*d*-alanin.

Die Darstellung dieses Dipeptids ist im wesentlichen die gleiche wie diejenige des *d*-Alanyl-glycins[1]).

5 g salzsaures *d*-Alanylchlorid, das nach der früheren Vorschrift dargestellt ist[2]), werden in eine auf 0^0 abgekühlte Lösung von 8,5 g *d*-Alanyläthylester, der durch Baryumoxyd getrocknet ist, in 70 ccm Chloroform in 5 Portionen im Laufe von etwa 20 Minuten eingetragen. Beim jedesmaligen Schütteln geht das Chlorid rasch in Lösung. Nach einstündigem Stehen der Lösung bei Zimmertemperatur wird das Chloroform unter stark vermindertem Druck verdampft. Der zurückbleibende farblose Sirup wird in wenig Methylalkohol gelöst und wiederum unter geringem Druck eingedampft, um das Chloroform möglichst zu entfernen. Dann wird von neuem in Methylalkohol gelöst, filtriert, auf 75 ccm verdünnt, in einer kleinen Probe das Chlor maßanalytisch bestimmt und zu der Hauptmenge die für das Chlor berechnete Quantität einer Natriummethylatlösung zugegeben, die 2 g Natrium auf 100 ccm reinen Methylalkohol enthält.

Nachdem das ausgeschiedene Kochsalz abfiltriert ist, wird die Lösung wiederum unter geringem Druck verdampft, der Rückstand mit Äthylalkohol ausgelaugt, vom ungelösten Kochsalz abfiltriert, abermals im Vakuum verdampft und jetzt der Rückstand viermal mit Petroläther gewaschen, um den Rest des Alaninesters zu entfernen. Der ölige Rückstand besteht dann zum großen Teil aus dem Ester des Dipeptids. Zur Verseifung wird er in 18 ccm *n*-Natronlauge, die auf 0^0 abgekühlt ist, gelöst und diese Lösung 2 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt. Dann fügt man zur Neutralisation des Alkalis 2,1 ccm 50-prozentiger Essigsäure hinzu, verdampft abermals unter geringem Druck, löst den Rückstand in kaltem absoluten Alkohol und erwärmt auf dem Wasserbade einige Zeit bis zum Sieden. Dabei erfolgt die Kristallisation des Dipeptids. Man läßt dann erkalten, etwa eine

---

1) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2921 [1905]. (*S. 545.*)

2) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2917 [1905]. (*S. 541.*)

Stunde bei gewöhnlicher Temperatur stehen und filtriert. Dieses Produkt ist nahezu rein. Die Ausbeute beträgt ungefähr 1 g, mithin nur 18% der Theorie, berechnet auf das angewandte salzsaure Alanylchlorid. Zur völligen Reinigung wird das Produkt in etwa 3 Teilen Wasser gelöst, wenn nötig filtriert und diese Flüssigkeit mit der 4—5-fachen Menge absolutem Alkohol versetzt. Beim Erkalten scheidet sich das Dipeptid häufig in zentimeterlangen, dünnen Prismen ab. Der Verlust beim Umkristallisieren ist gering.

Für die Analyse wurde das Präparat bei 100° getrocknet.

0,1423 g Sbst.: 0,2344 g CO_2, 0,0983 g H_2O. — 0,1778 g Sbst.: 26,4 ccm N (18°, 762 mm).

$C_6H_{12}O_3N_2$ (Mol. 160,17). Ber. C 44,95, H 7,55, N 17,53.
Gef. „ 44,93, „ 7,73, „ 17,26.

Für die optische Bestimmung diente eine wässerige Lösung von 7,1448 g Gesamtgewicht, die 0,3523 g Substanz enthielt. Sie drehte Natriumlicht bei 20° im 2-Dezimeterrohr 2,16° nach links und hatte das spez. Gewicht 1,017. Daraus berechnet sich die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = -21,6^0$.

Das Präparat wurde dann noch zweimal in obiger Weise umkristallisiert und zeigte jetzt in 5-prozentiger wässeriger Lösung genau die gleiche spezifische Drehung. Da eine dritte Bestimmung von einem anderen Präparat —21,5° gab, so scheint dies in der Tat der richtige Wert zu sein; wenigstens läßt er sich durch Umkristallisieren aus Wasser und Alkohol nicht mehr erhöhen.

Die Substanz hat wie alle Dipeptide keinen ganz konstanten Schmelzpunkt, weil sie bei höherer Temperatur Wasser verliert. Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr beobachtet man die Schmelzung gegen 298° (korr.); das ist ungefähr der Schmelzpunkt des entsprechenden aktiven Alaninanhydrids. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß der Schmelz- resp. Zersetzungspunkt des racemischen Alanylalanins ungefähr 20° niedriger ist, daß hier also dieselben Verhältnisse vorliegen wie bei dem aktiven und racemischen Alanylglycin.

Hydrolyse des Dipeptids. Beim Kochen mit Salzsäure wird die Verbindung wie alle ihre Verwandten gespalten und liefert dabei *d*-Alanin. Da das salzsaure Salz des letzteren nach rechts dreht, während das salzsaure Dipeptid eine starke Linksdrehung hat, so kann man durch die optische Untersuchung den Verlauf der Hydrolyse verfolgen. Ein solcher Versuch zeigt nun, daß diese Hydrolyse bei den einfachen Dipeptiden verhältnismäßig langsam vonstatten geht.

Eine Lösung von 0,3749 g Dipeptid in 6 ccm 10-prozentiger Salzsäure, die das Gesamtgewicht 6,6651 g hatte und mithin 5,6% Dipeptid enthielt, zeigt zuerst im Dezimeterrohr die Drehung 2,15° nach links,

woraus sich mit Berücksichtigung des spezifischen Gewichts für das *d*-Alanyl-*d*-alanin in salzsaurer Lösung die spezifische Drehung zu ungefähr —36,5° berechnet. Diese Lösung wurde im geschlossenen Rohr auf 100° erhitzt. Nach 5 Stunden war die Drehung auf +0,08° zurückgegangen; nach 7½ Stunden betrug sie +0,51°, nach 10 Stunden +0,72°, nach 15 Stunden +0,87° und blieb dann konstant. Der letzte Wert würde ungefähr der vollständigen Spaltung in *d*-Alanin entsprechen. Ganz genau können die Zahlen nicht sein, da bei der Hydrolyse eine geringe Racemisation stattfindet.

Die Berechnung obiger Zahlen ergibt, daß nach 5 Stunden ungefähr 73%, nach 7½ Stunden ungefähr 87% und nach 10 Stunden 94% Dipeptid gespalten waren. Aus diesen Zahlen erklärt sich auch, daß man bei der Spaltung der Proteïne mit konzentrierter Salzsäure 5—6 Stunden kochen muß, um eine völlige Spaltung bis zu den Aminosäuren zu erreichen.

d-Alanin-anhydrid (aktives *cis*-Dimethyldiketopiperazin).

Am reinsten wird die Verbindung gewonnen aus dem Ester des *d*-Alanyl-*d*-alanins durch alkoholisches Ammoniak.

Will man das Dipeptid selbst als Ausgangsmaterial benutzen, so verfährt man folgendermaßen: Das Dipeptid wird mit der 10-fachen Menge Alkohol übergossen und ohne Abkühlung gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet, wobei rasch Lösung erfolgt. Um die Veresterung zu vervollständigen, ist es ratsam, diese Lösung unter sehr geringem Druck zu verdampfen, dann dieselbe Menge Alkohol, wie oben, zuzufügen und das Einleiten von Salzsäure zu wiederholen. Die Flüssigkeit wird jetzt abermals unter sehr geringem Druck verdampft. Der Rückstand ist ein farbloser Sirup. Er wird mit sehr wenig Alkohol vermischt und in ungefähr die 10-fache Menge alkoholisches Ammoniak, das bei 0° gesättigt und auch auf 0° abgekühlt ist, eingetragen. Dabei erfolgt eine Trübung, die aber beim Umschütteln verschwindet. In dieser Lösung beginnt nach mehrstündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur die Abscheidung des Anhydrids in dünnen, aber ziemlich großen, glänzenden Blättchen. Es wird nach etwa 12 Stunden abfiltriert. Die Ausbeute beträgt 85—90% der Theorie. Einmaliges Umkristallisieren des Produktes aus der 10-fachen Menge heißen Wassers genügt zur völligen Reinigung. Es bildet dann silberglänzende feine Blättchen, die für die Analyse bei 100° getrocknet wurden.

0,1235 g Sbst.: 0,2297 g CO_2, 0,0766 g H_2O. — 0,1742 g Sbst.: 29,4 ccm N (15,5°, 762 mm).

$C_6H_{10}O_2N_2$ (Mol. 142,16). Ber. C 50,65, H 7,09, N 19,75.
Gef. „ 50,72, „ 6,94, „ 19,81.

Da die Substanz in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich ist, so mußte für die optische Untersuchung eine nur 2-prozentige Flüssigkeit verwandt werden.

Eine Lösung vom Gesamtgewicht 12,8787 g, die 0,2741 g Substanz enthielt, drehte Natriumlicht bei 20° im 2-Dezimeterrohr 1,23° ±0,02° nach links und hatte das spez. Gewicht 1,003. Daraus berechnet sich:

$$[\alpha]_D^{20} = -28,8^0 \pm 0,5^0 .$$

Nach zweimaligem Umkristallisieren aus der 10-fachen Menge Wasser war die spezifische Drehung unverändert. Im Kapillarrohr sehr rasch erhitzt, schmilzt es gegen 297° (korr.) zu einer schwach gelben Flüssigkeit, nachdem einige Grade vorher Sinterung stattgefunden hat.

Unter denselben Umständen schmilzt das einzige, bisher bekannte, inaktive Alaninanhydrid 15° niedriger. Wie alle solche Anhydride wird auch diese Verbindung weder von verdünnten Säuren, noch Alkalien in der Kälte gelöst. Sie schmeckt schwach bitter und färbt sich in wässeriger Lösung beim kurzen Kochen mit Kupferoxyd nicht.

Leichter und in derselben Reinheit erhält man das gleiche *d*-Alaninanhydrid aus dem Ester des Dipeptids, der bei dessen Synthese als Zwischenprodukt entsteht. Man verfährt, wie oben für die Synthese des Dipeptids angegeben ist, bis zu dem Punkte, wo das Chloroform abdestilliert ist. Dann löst man den Rückstand, der den salzsauren Dipeptidester enthält, in absolutem Alkohol, fügt die dem Chlor genau entsprechende Menge einer verdünnten Natriumäthylatlösung zu, filtriert vom abgeschiedenen Kochsalz ab und sättigt die alkoholische Lösung bei 0° mit gasförmigem Ammoniak. Nach 12 Stunden wird das abgeschiedene Anhydrid filtriert. Die Ausbeute betrug hier 36% der Theorie, berechnet auf das angewandte salzsaure *d*-Alanylchlorid, mithin doppelt so viel als diejenige des Dipeptids. Daraus geht hervor, daß ursprünglich die Synthese glatter verläuft, als man nach der schlechten Ausbeute an Dipeptid vermuten sollte.

Aus heißem Wasser umkristallisiert, zeigt das so erhaltene *d*-Alaninanhydrid die gleiche Drehung wie das oben beschriebene Präparat.

Eine Lösung vom Gesamtgewicht 8,0970 g, die 0,1599 g Anhydrid enthielt, drehte Natriumlicht bei 20° im 2-Dezimeterrohr 1,14° ±0,02° nach links und hatte das spez. Gewicht 1,003. Daraus:

$$[\alpha]_D^{20} = -28,8^0 \pm 0,5^0 .$$

Ungleich bequemer ist die Darstellung des Alaninanhydrids aus den Estern des *d*-Alanins durch Erwärmen, aber das Produkt wird, wie die optische Untersuchung zeigte, auf diesem Wege nicht so rein. Bei

dem *d*-Alaninäthylester geht die Anhydridbildung bei 100⁰ recht langsam vonstatten. Verwandt wurde für den Versuch ein Präparat, das mit Baryumoxyd sorgfältig getrocknet war. Erst nach 24-stündigem Erhitzen im Wasserbade schied sich ein Teil des Anhydrids kristallinisch aus. Nach 5-tägigem Erhitzen stieg aber die Ausbeute auf 82% der Theorie. Präparate verschiedener Darstellung zeigten nach dem Umlösen aus heißem Wasser eine erheblich geringere spezifische Drehung (-24^0, -26^0, $-26{,}8^0$), und durch weiteres Umkristallisieren konnten diese Werte nicht erhöht werden. Die Produkte enthielten also offenbar eine nicht unerhebliche Menge inaktives Anhydrid.

Viel rascher erfolgt die Anhydridbildung bei dem Methylester des *d*-Alanins. Schon nach 12-stündigem Erhitzen auf 100⁰ betrug hier die Ausbeute 73% der Theorie, und dieses Präparat zeigte dann die spezifische Drehung $[\alpha]_D = -27^0$; aber auch dieser Wert blieb bei weiterem Umlösen aus Wasser konstant. Nimmt man an, daß der obige Wert 28,8⁰ der richtige ist, so würde das letztere Präparat ungefähr 6% inaktives Anhydrid enthalten. Leider ist die Darstellung des Alaninmethylesters wegen der größeren Flüchtigkeit etwas schwieriger und verlustreicher als diejenige der Äthylverbindung. Trotzdem bin ich der Ansicht, daß seine Verwendung für die Anhydridbildung zu empfehlen ist, da die Reaktion so rasch erfolgt und ein reineres Präparat liefert. Für die meisten Zwecke dürfte die geringe Beimengung des inaktiven Produktes ohne Bedeutung sein.

Aufspaltung des *d*-Alanin-anhydrids.

Schüttelt man 1 g fein gepulvertes *d*-Alaninanhydrid mit 8 ccm *n*-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur, so ist schon nach 30 bis 40 Minuten der allergrößte Teil aufgelöst, und der Rest löst sich im Laufe der nächsten Stunde. Die Flüssigkeit blieb noch eine Stunde stehen, um die Hydrolyse zu vervollständigen; dann wurde mit 50-prozentiger Essigsäure schwach angesäuert und unter sehr geringem Druck zur Trockne verdampft. Der Rückstand löste sich in 25 ccm Alkohol völlig auf; als aber die Flüssigkeit zum Kochen erhitzt wurde, begann bald die Kristallisation des Dipeptids. Nachdem das Kochen 5 Minuten gedauert hatte, wurde die Flüssigkeit abgekühlt und der Niederschlag filtriert. Die Ausbeute an Dipeptid betrug 0,6 g. Das in wenig Wasser gelöste und mit Alkohol gefällte Präparat zeigte in wässeriger, 5-prozentiger Lösung die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = -12{,}0^0$. Daraus ergibt sich, daß fast die Hälfte desselben inaktiv war. Auch die undeutliche Kristallform weist auf ein Gemisch von aktivem und inaktivem Dipeptid hin. Dieser Weg ist also für die Darstellung von reinem, aktivem Dipeptid nicht geeignet.

Diglycyl-glycinmethylester,

$NH_2.CH_2.CO.(NHCH_2CO).NH.CH_2.COOCH_3$.

Daß die Veresterung des Tripeptids leicht erfolgt, ist schon früher für die Äthylverbindung gezeigt worden[1]). Um den Methylester darzustellen, übergießt man 6 g Tripeptid mit 90 ccm trocknem Methylalkohol und leitet ohne Kühlung einen starken Strom von Salzsäuregas ein. Dabei tritt Erwärmung und Lösung ein; bald nachher findet gewöhnlich Kristallisation des salzsauren Methylesters statt, der bei weiterem Einleiten der Salzsäure und stärkerer Erwärmung wieder in Lösung geht. Man kühlt dann die Lösung auf 0° ab, saugt nach 1 Stunde das reichlich ausgeschiedene Methylesterchlorhydrat ab und wäscht mit Äther. Die Ausbeute beträgt etwa 6,2 g. Die Mutterlauge gibt nach dem Eindampfen unter stark vermindertem Druck eine zweite Kristallisation. Das Salz ist nach dem Trocknen im Vakuum über Natronkalk für die weitere Darstellung des freien Esters rein genug.

Zur völligen Reinigung wurde es einmal aus der 10-fachen Menge (12 Volumteile) heißem Methylalkohol umkristallisiert, wobei, wenn stark gekühlt wird, ungefähr $^2/_3$ ausfallen, während man den Rest durch Äther fällen kann.

Für die Analyse wurde im Vakuumexsikkator getrocknet.

0,1574 g verbrauchten 6,38 ccm $^1/_{10}$ *n*-Silberlösung.

$C_7H_{13}O_4N_3.HCl$ (Mol. 239,5). Ber. Cl 14,8. Gef. Cl 14,4.

Das Salz kristallisiert aus Methylalkohol in glänzenden, sehr kleinen Blättchen. Im Kapillarrohr rasch erhitzt, beginnt es gegen 200° (korr.) zu sintern und schmilzt gegen 204° (korr.) unter Aufschäumen.

Für die Bereitung des freien Äthylesters wurde früher das Hydrochlorat mit Silberoxyd zerlegt. Viel bequemer ist die Operation mit Natriummethylat. Man löst 5 g Methylesterhydrochlorat in 150 ccm heißem Methylalkohol, kühlt rasch ab und fügt, bevor Kristallisation eingetreten ist, die zur Bindung des Chlors berechnete Menge einer Lösung zu, die auf 100 ccm Methylalkohol 2 g Natrium enthält. Hierbei findet keine Abscheidung statt. Man verdampft die Flüssigkeit rasch unter geringem Druck zur Trockne, laugt mit 40 ccm warmem Chloroform aus und fällt das abgekühlte Filtrat mit Äther. Die Ausbeute an Methylester beträgt 3,5 g oder 84% der Theorie. Dieses Präparat kann direkt für die nachfolgend beschriebene Umwandlung in Pentaglycylglycin verwendet werden.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2984 [1903]. (*S. 328.*)

Zur völligen Reinigung wird das Präparat mit ungefähr 10 Volumteilen warmem Chloroform ausgelaugt, wobei eine kleine Menge eines unlöslichen Kondensationsproduktes zurückbleibt. Versetzt man das warme Filtrat mit Äther bis zur beginnenden Trübung, so scheidet sich der Methylester beim Erkalten in farblosen, manchmal zentimeterlangen und häufig sternförmig gruppierten Nadeln oder sehr dünnen Prismen ab, die für die Analyse im Vakuumexsikkator getrocknet wurden.

0,1679 g Sbst.: 0,2536 g CO_2, 0,0976 g H_2O. — 0,1590 g Sbst.: 28,4 ccm N (19°, 761 mm).

$C_7H_{13}O_4N_3$ (Mol. 203). Ber. C 41,34, H 6,45, N 20,73.
Gef. „ 41,20, „ 6,50, „ 20,63.

Der Ester hat keinen ganz scharfen Schmelzpunkt. Das reinste Präparat schmolz im Kapillarrohr gegen 111° (korr.), verwandelte sich aber rasch bei derselben Temperatur in das unten beschriebene, feste Kondensationsprodukt. Er löst sich leicht in Wasser und reagiert auf Lakmus stark alkalisch. Auch in Alkohol und heißem Chloroform löst er sich leicht, dagegen sehr schwer in Äther.

Pentaglycyl-glycinmethylester,

$NH_2.CH_2.CO.(NHCH_2CO)_4.NH.CH_2.COOCH_3$.

Gepulverter Diglycylglycinmethylester wird in dünner Schicht in einem offenen Kolben auf 100° erhitzt. Ohne zu schmelzen, kondensiert er sich dabei unter Abgabe von Methylalkohol. Bei Mengen von 2—3 g ist die Operation in einer halben Stunde beendigt. Man kann dafür den rohen Diglycylglycinmethylester verwenden. Wie schon erwähnt, besteht das Rohprodukt der Kondensation aus zwei Körpern, zu deren Trennung man mit der 7-fachen Menge kochendem Wasser behandelt und von dem amorphen, sehr fein verteilten Rückstand heiß abfiltriert. Beim Erkalten scheidet sich der Pentaglycyl-glycinmethylester als dicke, weiße Masse ab, die nach einstündigem Stehen bei 0° abgesaugt und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen wird. Die Ausbeute beträgt etwa 70% vom Gewicht des angewandten Diglycylglycinmethylesters oder 76% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wurde das Produkt nochmals aus der 8-fachen Menge heißem Wasser umgelöst, abgesaugt, erst auf porösem Ton, dann im Vakuumexsikkator und schließlich kurze Zeit im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,2003 g Sbst.: 0,3043 g CO_2, 0,1085 g H_2O. — 0,1774 g Sbst.: 34,0 ccm N (16,0°, 763 mm).

$C_{13}H_{22}O_7N_6$ (Mol. 374,4). Ber. C 41,66, H 5,92, N 22,51.
Gef. „ 41,43, „ 6,06, „ 22,49.

Die Substanz hat keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzt sich zwischen 200° und 300°. Selbst bei 100° wird sie allmählich in eine amorphe, in Wasser unlösliche Substanz verwandelt, die mit dem bei ihrer Darstellung entstehenden Nebenprodukt die größte Ähnlichkeit hat. Aber diese Verwandlung erfolgt so langsam, daß nach 6-stündigem Erwärmen auf 100° nur der kleinere Teil davon betroffen war. Aus heißem Wasser scheidet sie sich als sehr feiner Niederschlag ab, der unterm Mikroskop keine deutliche Kristallform zeigt. Die wässerige Lösung reagiert schwach alkalisch. In Alkohol ist die Substanz sehr schwer löslich, dagegen wird sie von verdünnten Mineralsäuren, besonders bei gelinder Wärme, als Salz leicht gelöst. Die wässerige Lösung gibt starke Biuretfärbung. Durch verdünnte, wässerige Alkalien wird sie ziemlich rasch gelöst und verseift.

Ebenso leicht wie der Methylester des Diglycylglycins läßt sich der Ester des Leucyl-glycyl-glycins durch Erhitzen kondensieren, und ich zweifle nicht daran, daß es sich hier um eine allgemeine Reaktion handelt, die ich auch auf die Tetra- und Pentapeptide anwenden will.

Pentaglycyl-glycin,

$NH_2.CH_2.CO.(NHCH_2CO)_4.NH.CH_2.COOH.$

Der Methylester wird in der 5-fachen Menge Wasser fein verteilt, was man am raschesten durch Erhitzen bis zum Sieden und Abkühlen erreicht. Man fügt dann die für $1^1/_4$ Molekül berechnete Menge starker Natronlauge zu und schüttelt bei Zimmertemperatur $^1/_2$—1 Stunde. Dabei geht der allergrößte Teil unter gleichzeitiger Verseifung in Lösung. In der Flüssigkeit bleibt in geringer Menge ein amorphes Produkt suspendiert, das vom Alkali nicht mehr angegriffen wird. Da es schwer abzufiltrieren ist, so versetzt man direkt mit etwas mehr als der berechneten Menge Essigsäure, wodurch das Hexapeptid als dicker Niederschlag ausgefällt wird. Es wird nach einigem Stehen bei 0° möglichst abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Zur Reinigung löst man in heißem, verdünntem Ammoniak; auf 4 g ursprünglichen Methylester wurden 45 ccm Wasser und 8 ccm wässeriges Ammoniak (von 25%) angewandt. In der Hitze geht das Hexapeptid ganz in Lösung, während der beigemengte, obenerwähnte, amorphe Körper ungelöst bleibt. Um die Filtration zu erleichtern, fügt man noch etwas Tierkohle hinzu und kocht auf. Wird das klare, farblose Filtrat verdampft, bis fast alles Ammoniak verjagt ist, so fällt das Hexapeptid als körniges, weißes Pulver heraus und wird nach völligem Erkalten der Lösung filtriert. Die Mutterlauge gibt bei weiterem Einengen eine zweite, aber weit geringere Menge des gleichen Präparates. Die Aus-

beute ist recht befriedigend, denn sie betrug bei Anwendung des rohen Methylesters 75% der Theorie.

Zur völligen Reinigung wurde das Hexapeptid nochmals in der gleichen Art aus heißem, verdünntem Ammoniak umgelöst, mit Wasser und Alkohol gewaschen, erst im Vakuumexsikkator und zuletzt für die Analyse im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1774 g Sbst.: 0,2602 g CO_2, 0,0880 g H_2O. — 0,1850 g Sbst.: 37,0 ccm N (18°, 765 mm).

$C_{12}H_{20}O_7N_6$ (Mol. 360,4). Ber. C 39,96, H 5,59, N 23,38.
Gef. „ 40,00, „ 5,55, „ 23,35.

Das Pentaglycylglycin hat ebensowenig, wie sein Methylester, einen Schmelzpunkt. Im Kapillarrohr beginnt es gegen 256° (korr.) braun zu werden und zersetzt sich bei höherer Temperatur völlig ohne Schmelzung. Es ist in Alkohol unlöslich und in Wasser, selbst in der Hitze, sehr schwer löslich. Es übertrifft darin noch das ebenfalls in Wasser schon schwer lösliche Tetraglycylglycin. Angesichts dieser geringen Löslichkeit des nur aus Glycin zusammengesetzten Penta- und Hexapeptids verdient die große Löslichkeit des zuvor beschriebenen Leucyl-tetraglycyl-glycins und Leucyl-pentaglycyl-glycins hervorgehoben zu werden. Soweit die bisherigen Erfahrungen reichen, scheinen die gemischten Polypeptide meistens in Wasser löslicher zu sein, als die einfachen Formen.

Aus der Lösung in verdünntem Ammoniak fällt Pentaglycylglycin beim Wegkochen des Ammoniaks als ziemlich schweres, körniges Pulver aus, das aber keine deutliche Kristallform zeigt. In verdünnten Alkalien ist es sehr leicht löslich, und diese Lösung gibt mit Kupfersalzen eine sehr starke Biuretfärbung.

In sehr verdünnten Mineralsäuren löst es sich besonders bei gelindem Erwärmen leicht. Von den hierbei entstehenden Salzen ist das Nitrat am schönsten, denn es kristallisiert beim Erkalten in hübschen, mikroskopisch kleinen Nädelchen, die aus gleichen Molekülen Peptid und Salpetersäure bestehen. Für seine Bereitung wurde 1 g Pentaglycylglycin in 5 ccm Wasser und 1,3 ccm Salpetersäure vom spez. Gewicht 1,17 warm gelöst. Beim Abkühlen begann bald die Kristallisation, und nach einstündigem Stehen bei 0° war die Abscheidung so vollkommen, daß die Ausbeute 1 g oder 85% der Theorie betrug. Es wurde abgesaugt, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen, dann zuerst im Vakuumexsikkator und zuletzt für die Analyse bei 100° im Vakuum getrocknet.

0,1648 g Sbst.: 0,2061 g CO_2, 0,0760 g H_2O.

$C_{12}H_{20}O_7N_6 . HNO_3$. Ber. C 34,0 H 5,0.
Gef. „ 34,1, „ 5,2.

Außerdem wurde die Salpetersäure nach der Methode von Busch mit „Nitron" bestimmt.

0,2489 g Sbst.: 0,2084 g Nitronnitrat.

$C_{12}H_{20}O_7N_6.HNO_3$. Ber. HNO_3 14,9. Gef. HNO_3 14,1.

Im Kapillarrohr schnell erhitzt, schmilzt das Salz gegen 240° (korr.) unter starker Gasentwickelung, nachdem es vorher schon gelb geworden ist.

Der obenerwähnte Körper, der bei der Darstellung des Pentaglycyl-glycinmethylester als Nebenprodukt entsteht, ist wahrscheinlich ein höheres Kondensationsprodukt. Er löst sich teilweise in warmer, sehr verdünnter Natronlauge, und diese Lösung gibt eine starke Biuretfärbung. Er löst sich viel leichter und vollkommener in kalter Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19, und auf Zusatz von Wasser entsteht ein starker Niederschlag. Wird die salzsaure Lösung aber 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt, so ist die Fällung durch Wasser sehr gering. Nach dem Resultat der Analyse (Gef. C 41,3; H 5,7; N 23,1) könnte der Körper der Methylester eines Dodecaglycins sein; da aber seine Einheitlichkeit zweifelhaft ist, so lege ich darauf keinen besonderen Wert und behalte mir nähere Angaben über seine Zusammensetzung vor.

Bei der Ausführung dieser Versuche habe ich mich der ebenso eifrigen, wie geschickten Hilfe der Herren Dr. Ferdinand Reuter und Dr. Walter Axhausen erfreut, wofür ich ihnen besten Dank sage.

---

39. Emil Fischer und Peter Bergell: Über die Derivate einiger Dipeptide und ihr Verhalten gegen Pankreasfermente.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **36**, 2592 (1903).
(Eingegangen am 9. Juli.)

Bei der successiven Spaltung des Seidenfibroïns durch Salzsäure, Trypsin und Barythydrat erhielten wir ein Produkt, welches nach den Eigenschaften und der Zusammensetzung der β-Naphtalinsulfoverbindung in die Klasse der Dipeptide gehört und uns eine Kombination von Glycin mit Alanin zu sein schien, da es bei totaler Hydrolyse diese beiden Aminosäuren gab[1]). Um die Konstitution dieses Stoffes aufzuklären, haben wir versucht, ihn synthetisch zu bereiten nach dem Verfahren, welches der eine von uns kürzlich zur Herstellung des β-Naphtalinsulfoglycylglycins und des racemischen β-Naphtalinsulfoglycylalanins benutzte[2]). Wir haben also das β-Naphtalinsulfoglycin durch Thionylchlorid in das entsprechende Chlorid verwandelt und mit dem Ester des aktiven *d*-Alanins kombiniert. Auf dieselbe Weise wurde das aktive β-Naphtalinsulfo-*d*-alanin mit Glykocoll verknüpft. Leider war keiner von diesen beiden synthetischen Körpern identisch mit dem Produkt aus Seide. Allerdings bleibt noch die Möglichkeit, daß letzteres ein Gemisch der beiden ersteren ist und wir werden diese Vermutung näher prüfen. Die Beschäftigung mit den Dipeptiden hat uns gelegentlich zu einigen Versuchen über ihr Verhalten gegen die Pankreasenzyme veranlaßt, deren Resultat einen weiteren Beweis für die nahe Verwandtschaft dieser Körper mit den natürlichen Proteïnstoffen gibt.

Bekanntlich beobachtet man bei der tryptischen Verdauung der Eiweißstoffe zuerst Tyrosin und Leucin, nicht allein, weil sie besonders leicht nachweisbar sind, sondern auch, weil sie, wie es scheint, allgemein leichter als die anderen Aminosäuren bei der Hydrolyse von

---

[1]) Vortrag auf der Naturforscherversammlung zu Karlsbad 1902. Ein Autoreferat über denselben findet sich in der Chemikerzeitung vom 4. Oktober 1902 Nr. 80. (*S. 621.*)

[2]) Sitzungsbericht der Kgl. Preuß. Akademie der Wissenschaften 1903, XIX, 387 und Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2094 [1903]. (*S. 313.*)

Proteïnstoffen, Peptonen und dergleichen in Freiheit gesetzt werden. Ein typisches Beispiel dieser Art haben wir selbst gefunden bei dem durch die Einwirkung von Salzsäure auf Seidenfibroïn entstehenden Pepton, dessen wässerige Lösung nach Zusatz von Pankreatin im Brutschrank bereits nach etwa 15 Minuten unter günstig gewählten Bedingungen eine Kristallisation von Tyrosin gibt, während die übrigen in diesem Pepton enthaltenen Aminosäuren, Glykocoll und Alanin, auch nach tagelanger Verdauung noch nicht nachweisbar sind. Ähnliche Unterschiede zeigten sich nun auch bei den Naphtalinsulfo- und Carbäthoxylderivaten der synthetischen Dipeptide. Im Gegensatz zu den Abkömmlingen des Glycylglycins, die gegen Pankreasenzyme sehr resistent sind, werden die Verbindungen des Glycyltyrosins relativ leicht unter Abspaltung von Tyrosin zerlegt. Besonders interessant gestaltet sich das Phänomen beim inaktiven Carbäthoxylglycyl-*dl*-leucin. Denn die Wirkung des Enzyms geht hier asymmetrisch vor sich, insofern als sie vorzugsweise die eine Hälfte des Racemkörpers betrifft. Sie führt nämlich zur Abspaltung von *l*-Leucin. Als Nebenprodukt muß man dabei Carbäthoxylglycyl-*d*-leucin erwarten, welches wir allerdings in reinem Zustand noch nicht isoliert haben.

Die bisherigen Versuche, einfachere chemische Verbindungen durch Trypsin zu spalten und so den Mechanismus der Wirkung dieses Enzyms bei der Eiweißverdauung zu verfolgen, haben kein positives Resultat ergeben. Zwar will Nencki[1]) die Hippursäure teilweise durch Pankreasenzyme gespalten haben. Aber weder Gulewitsch[2]) noch wir konnten bei der Nachprüfung seiner Angabe eine Entstehung von Benzoësäure konstatieren.

Ein negatives Resultat erhielten wir auch bei Versuchen, das einfachste Dipeptid, das Glycylglycin, oder die Naphtalinsulfoderivate der isomeren Dipeptide, welche aus Glykocoll und *d*-Alanin bestehen, fermentativ zu zerlegen.

Aus den vorstehenden Beobachtungen geht hervor, daß die Hydrolyse von Dipeptiden und ihren Derivaten durch Pankreatin von sehr verschiedenen Faktoren, d. h. von der Natur der Aminosäure, von ihrem sterischen Bau und endlich bei den Derivaten auch von der Zusammensetzung des ganzen Moleküls abhängig ist. Diese Unterschiede werden sich bei den höheren Polypeptiden zweifellos in größerer Mannigfaltigkeit wiederholen, und man kann sich danach ungefähr eine Vorstellung darüber machen, wie verschiedenartig der Angriff des Enzyms sich bei den noch viel komplizierter zusammengezetzten Proteïnstoffen gestalten muß.

---

[1]) M. Nencki, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. **20**, 377.

[2]) Wl. Gulewitsch, Zeitschr. für physiol. Chem. **27**, 540 [1899].

β-Naphtalinsulfoglycyl-*d*-Alanin,
$C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).COOH$.

5 g β-Naphtalinsulfoglycin werden mit 15 g Thionylchlorid übergossen und so lange erwärmt, bis alles in Lösung gegangen. Nach dem Verdampfen des überschüssigen Thionylchlorids im Vakuum unter 40⁰ wird der Rückstand in Chloroform gelöst und mit einer Lösung von 9 g *d*-Alaninester ebenfalls in Chloroform vermischt. Die Lösung erwärmt sich. Nach einstündigem Stehen wird das Chloroform unter vermindertem Druck verdampft, der gelbe Rückstand mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und in 60 ccm Normal-Natronlauge gelöst. Übersättigt man nach 16-stündigem Stehen mit Salzsäure, so fällt ein weißes Öl, das schnell kristallinisch erstarrt. Unter Anwendung von Tierkohle wird aus heißem Wasser umkristallisiert. Die Verbindung fällt zuerst in kleinen, winzigen Nädelchen, nach wiederholtem Umkristallisieren bildet sie große, glänzende Blättchen, welche bei 151 bis 152⁰ (154—155⁰ korr.) schmelzen. Zur Analyse wurde sie im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Beim Trocknen bei 85⁰ verlor sie kein Wasser.

0,1936 g Sbst.: 0,3789 g CO_2, 0,0850 g H_2O. — 0,1952 g Sbst.: 13,8 ccm N (15⁰, 765 mm).

$C_{15}H_{16}O_5N_2S$. Ber. C 53,57, H 4,76, N 8,33.
Gef. „ 53,38, „ 4,87, „ 8,34.

Kristallisiert man aus heißem Wasser in sehr verdünnter Lösung und läßt langsam erkalten, so scheidet sich die Substanz manchmal in glänzenden Blättchen ab, welche ein Molekül Kristallwasser enthalten.

1,1330 g Sbst. verlieren bei 87⁰ 0,0608 g H_2O.
Ber. 5,08. Gef. 5,36.

Der Schmelzpunkt dieser kristallwasserhaltigen Verbindung ist gleichfalls 151—152⁰, dieselbe sintert jedoch etwas unter 100⁰.

Die alkalische Lösung der Säure ist rechtsdrehend.

1,0722 g wurden in 7,5 ccm Normal-Natronlauge und ca. 6 ccm Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 15,2452 g, mithin Prozentgehalt 7,03. Spez. Gewicht 1,0386. Im 2-Dezimeterrohr drehte die Lösung 1,04⁰ nach rechts bei weißem Licht. Daraus berechnet sich die spez. Drehung = +7,11.

Die Verbindung löst sich in 2012 Teilen Wasser von 20⁰. Von kochendem Wasser verlangt sie etwa 50 Teile. In Alkohol ist sie leicht löslich, schwer in Äther.

Von den Salzen sind Silber- und Bleiverbindung schwer löslich, aber amorph. Im Gegensatz zu dem isomeren β-Naphtalinsulfo-*d*-alanyl-

glycin bildet das vorliegende Dipeptidderivat kein schwerlösliches Calcium- oder Baryumsalz.

β-Naphtalinsulfo-*d*-alanyl-glycin,
$C_{10}H_7.SO_2.NH(CH_3).CO.NH.CH_2.COOH$.

6,5 g scharf getrocknetes *β*-Naphtalinsulfo-*d*-alanin werden mit 15 g Thionylchlorid gelinde erwärmt, wobei es leichter reagiert und schneller als die Glycinverbindung in Lösung geht. Beim Abdampfen des Thionylchlorids im Vakuum unter 40° erstarrt der Rückstand fast vollständig zu Nadeln, welche zu Sternen und Büscheln zusammengelagert sind. Dieselben werden sofort in Chloroform gelöst und mit einer Lösung von 7 g Glycinester in Chloroform vermischt. Es tritt lebhafte Reaktion ein, nach deren Beendigung unter vermindertem Druck eingedampft wird, wobei bald Ausscheidung von salzsaurem Glykocollester beginnt. Der Rückstand wird mit Wasser gewaschen und zur Verseifung in 70 ccm Normal-Alkali gelöst. Nach 16 Stunden wird mit Tierkohle geschüttelt, filtriert und angesäuert. Es fällt ein weißes Öl, das schnell erstarrt. Löst man das Produkt in der 50-fachen Menge heißen Wassers, so erstarrt die Lösung beim Erkalten zu einem Brei von Kristallen, die unter dem Mikroskop als glänzende Blättchen erscheinen und beim Absaugen eine voluminöse, blätterige Masse von seidigem Glanz geben. Die zuerst erhaltenen Kristalle schmelzen bei 154—156°, nach einmaligem Umkristallisieren steigt der Schmelzpunkt auf 176°. Die reine Substanz schmilzt scharf bei 177—178° (180,5—181,5° korr.).

Zur Analyse wurde bei 80° getrocknet.

0,1864 g Sbst.: 0,3663 g CO_2, 0,0819 g H_2O. — 0,1786 g Sbst.: 12,2 ccm N (19°, 765 mm).

$C_{15}H_{16}O_5N_2S$. Ber. C 53,57, H 4,76, N 8,33.
Gef. „ 53,59, „ 4,88, „ 7,91.

Die Substanz war stets kristallwasserfrei.

Die alkalische Lösung dreht das polarisierte Licht nach links. 0,8868 g Substanz wurden in 7 ccm Normal-Natronlauge und 9 ccm Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 17,0816 g. Dieselbe enthielt demnach 5,19% der Säure. Spez. Gewicht 1,0344. Die Lösung drehte im 2-Dezimeterrohr 6,84° nach links bei weißem Licht. Hieraus berechnet sich eine spezifische Drehung von −63,71°.

Die Verbindung löst sich in 711 Teilen Wassers von 20°. Von kochendem Wasser verlangt sie etwa 50 Teile. In Alkohol ist sie leicht, in Äther schwer löslich.

Der Äthylester wird in üblicher Weise dargestellt durch Übergießen der freien Säure mit der 10-fachen Menge Alkohol und Einleiten

von Salzsäure unter mäßiger Kühlung bis zur Sättigung. Beim Eingießen der Lösung in viel kaltes Wasser entsteht zunächst nur eine Trübung, nach mehrstündigem Stehen tritt aber Kristallisation ein. Der in Wasser recht schwer lösliche Ester wird aus verdünntem Alkohol umkristallisiert. Beim langsamen Erkalten scheidet er sich in bis 1 cm langen Nadeln ab, die sich büschelförmig aneinander lagern. Er schmilzt bei 103° (104° korr.), ist kristallwasserfrei und wurde zur Analyse bei 85° getrocknet.

0,1933 g Sbst.: 0,3966 g CO_2, 0,098 g H_2O.

$C_{17}H_{20}SO_5N_2$. Ber. C 56,04, H 5,49.
Gef. „ 55,95, „ 5,63.

Von den Salzen sind Silber- und Bleiverbindung in kaltem Wasser sehr schwer löslich, die Calcium- und Baryumsalze etwas leichter löslich, jedoch besser kristallisierend. Zur Bereitung des Calciumsalzes versetzt man die Lösung des Ammoniumsalzes mit Chlorcalcium. Bei genügender Konzentration beginnt nach einiger Zeit die Kristallisation von Nadeln, die sich zu Sternen und Sektoren zusammenlagern. Das Baryumsalz wird auf die gleiche Art erhalten und bildet makroskopische, zu Sternen gruppierte Nadeln.

Ergänzungsweise erwähnen wir hier auch die Salze des früher beschriebenen β-Naphtalinsulfoglycyl-glycin. Das Silbersalz ist in kaltem Wasser schwer löslich und kristallisiert in sehr dünnen, rhombischen Tafeln und Blättchen. Das Baryumsalz bildet Nadeln und ist auch in heißem Wasser schwer löslich. Das Magnesiumsalz ist leichter löslich, auch in kaltem Wasser. Es kristallisiert in sehr feinen Nadeln, die sternförmig zusammenliegen. Das Bleisalz wird erhalten durch Fällen der Ammoniumsalzlösung mit Bleiacetat. Es ist sehr schwer löslich in kaltem Wasser. Auch von heißem Wasser wird es nur wenig gelöst und kristallisiert beim Abkühlen sofort in sehr dünnen, glitzernden Blättchen. Das Calciumsalz ist in kaltem Wasser schwer löslich. In heißem Wasser ist es leichter löslich als das Baryum- oder Bleisalz; es kristallisiert beim langsamen Erkalten in langen, sehr dünnen, vorn zugespitzten Blättern und feinen Nadeln.

Trennung von β-Naphtalinsulfoglycyl-*d*-Alanin und β-Naphtalinsulfo-*d*-alanyl-glycin.

Um Gemische von Glycyl-*d*-alanin und *d*-Alanylglycin, wie sie bei der Hydrolyse von natürlichen Proteïnen, z. B. Seide, entstehen können, mit Hilfe der Naphtalinsulfoverbindungen trennen zu können, haben wir folgendes Verfahren ausgearbeitet, das auf der geringen Löslichkeit von Calcium- und Baryumsalzen des β-Naphtalinsulfo-*d*-alanylglycins beruht.

Ein Gemisch von gleichen Teilen beider Naphtalinsulfoverbindungen, das, beiläufig bemerkt, gegen 124° sintert und zwischen 130° und 136° schmilzt, wird in der 27-fachen Menge Wasser unter Zusatz von Ammoniak gelöst, dann das überschüssige Ammoniak weggekocht, und die Flüssigkeit jetzt mit Chlorbaryumlösung versetzt. Sie trübt sich etwas und scheidet bei mehrstündigem Stehen im Eisschrank eine reichliche Menge von Kristallen ab. Diese werden nach 12 Stunden abfiltriert, das Filtrat auf die Hälfte eingeengt und nochmals mehrere Tage im Eisschrank aufbewahrt, wobei wiederum eine Kristallisation erfolgt.

Das Filtrat wird nun mit Salzsäure übersättigt, wobei ein farbloses, bald erstarrendes Öl ausfällt. Durch mehrmaliges Umlösen des Produktes aus heißem Wasser erhält man ein Präparat vom Schmp. 152°, dessen ammoniakalische Lösung rechts dreht und welches alle Eigenschaften des β-Naphtalinsulfoglycyl-*d*-alanins besitzt.

Das auskristallisierte Baryumsalz wird ebenfalls mit Salzsäure zerlegt. Die daraus entstehende freie Säure ist zum größten Teil β-Naphtalinsulfo-*d*-alanyl-glycin. Sie enthält aber als Verunreinigung eine wechselnde Quantität der isomeren Säure. Zur völligen Trennung wird das Gemisch, das bei 154—156° schmilzt, wieder in 25 ccm Wasser und etwas Ammoniak gelöst und die Flüssigkeit nach Wegkochen des überschüssigen Ammoniaks mit Chlorcalcium versetzt. Nach wenigen Minuten beginnt die Kristallisation des Calciumsalzes, und die hieraus isolierte, freie Säure bildet dann glänzende Blättchen, welche den Schmp. 178° und auch die übrigen Eigenschaften, z. B. die spezifische Drehung des reinen β-Naphtalinsulfo-*d*-alanyl-glycins zeigen.

Verhalten von Glycylglycin, β-Naphtalinsulfoglycyl-*d*-alanin, β-Naphtalinsulfo-*d*-alanyl-glycin und von Hippursäure gegen Pankreatin.

Wie zuvor schon erwähnt, konnten wir bei allen vier Verbindungen keine Hydrolyse durch das Ferment feststellen. Da aber derartige Resultate immer nur gültig sind für die Bedingungen, unter denen die Versuche ausgeführt sind, so scheint es uns nötig, letztere ausführlich zu beschreiben.

I. Glycylglycin. 2 g reines salzsaures Glycylglycin wurden in wässeriger Lösung mit der berechneten Menge Natronlauge in die freie Base verwandelt, dann die Flüssigkeit auf 25 ccm verdünnt und mit 0,05 g trocknem Natriumcarbonat und 0,5 g Pankreatin (von der Firma Rhenania) versetzt. Nach Zusatz von etwa 1 ccm Toluol blieb die Flüssigkeit 6 Tage bei 36° stehen und wurde dann auf die Anwesenheit

von Glykocoll geprüft. Um dieses neben Glycylglycin zu erkennen, bedient man sich am besten der β-Naphtalinsulfoverbindung. Zu dem Zweck wird die Flüssigkeit mit β-Naphtalinsulfochlorid unter Zusatz von Alkali in der früher beschriebenen Weise behandelt.

Reines Glycylglycin gibt dabei ein β-Naphtalinsulfoderivat, welches sofort oder nach einmaligem Umkristallisieren den Schmp. 178° (180° korr.) zeigt. Sind nur geringe Mengen von Glykocoll zugegen, so entsteht ein Gemisch von Naphtalinsulfoverbindungen, dessen Schmelzpunkt erheblich niedriger liegt. So gab ein Gemisch von 0,9 g Glycylglycin und 0,1 g Glykocoll mit Naphtalinsulfochlorid einen kristallinischen Niederschlag, der schon bei 140° anfing zu sintern und von 154° an langsam zu einem Öl schmolz, das bei 168° ganz klar und leichtflüssig war.

Bei obigem Versuch mit Pankreatin erhielten wir nun aus der Lösung, die 6 Tage mit dem Enzym gestanden hatte, ein β-Naphtalinsulfoderivat, das sofort bei 178° (unkorr.) schmolz und dessen Menge 64% der Theorie, berechnet auf das angewandte Glycylglycin, betrug. Zu der letzten Zahl bemerken wir, daß reines Glycylglycin auch nur eine Ausbeute von 70% gegeben hat. Wir schließen aus diesen Daten, daß Glycylglycin durch das Enzym nicht in irgendwie erheblicher Menge gespalten war.

Bei einem zweiten Versuch wurde die mit Ferment behandelte Lösung vor der Behandlung mit Naphtalinsulfochlorid geteilt und einer Hälfte absichtlich Glykocoll und zwar 5% vom Gewicht des angewandten Glycylglycins zugesetzt. Die mit dieser Portion erhaltene β-Naphtalinsulfoverbindung sinterte bereits bei 150° und schmolz von 154—165°, während die aus der anderen Lösung gewonnene Substanz bei 170° anfing zu sintern, bei 175° schmolz und den Stickstoffgehalt des Naphtalinsulfoglycylglycins zeigte (gef. 8,9; ber. 8,7).

II. β-Naphtalinsulfo-*d*-alanyl-glycin. 0,3 g wurden in etwa 5 ccm Wasser unter Zugabe von wenig Ammoniak gelöst, dann mit 0,1 g Pankreatin und etwas Toluol 6 Tage bei 36° aufbewahrt. Die hierauf filtrierte Flüssigkeit gab beim Übersättigen mit Salzsäure einen Niederschlag der unveränderten Verbindung vom Schmp. 177 bis 178° (unkorr.). Seine Menge betrug 0,25 g, mithin 83% der angewandten Menge. Hätte Hydrolyse in irgendwie erheblichem Maße stattgefunden, so wäre dem Niederschlag β-Naphtalinsulfo-*d*-alanin beigemengt gewesen und das hätte eine sehr erhebliche Erniedrigung des Schmelzpunktes zur Folge haben müssen.

III. β-Naphtalinsulfoglycyl-*d*-alanin. Der Versuch war genau in derselben Weise wie der vorhergehende ausgeführt. Auch hier zeigte das wiedergewonnene Produkt sofort den richtigen Schmelz-

punkt 151—152^0 (unkorr.) und auch die optische Aktivität des Ausgangsmaterials.

IV. Hippursäure. 4 g der Säure wurden in der berechneten Menge Natronlauge gelöst, dann einige Tropfen einer Sodalösung zugefügt, das Gemisch auf 40 ccm verdünnt und nach Zusatz von 0,5 g Pankreatin 36 Stunden bei 36^0 aufbewahrt. Dann wurde die Flüssigkeit mit Salzsäure übersättigt und ohne Filtration des Niederschlages sofort mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Der beim Verdampfen des Äthers bleibende Rückstand war in kochendem Petroläther völlig unlöslich, enthielt mithin keine Benzoësäure.

Der gleiche Versuch wurde mit 1 g Hippursäure und 1 g Pankreatin wiederholt und gab dasselbe negative Resultat.

Dieses stimmte ganz überein mit den Erfahrungen, welche früher Gulewitsch, Gonnermann und in neuester Zeit M. Schwarzschild gemacht haben.

β-Naphtalinsulfoglycyl-Tyrosin,

$C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(COOH).CH_2.C_6H_4.OH.$

1 g β-Naphtalinsulfoglycin[1]) wird mit 8 g Thionylchlorid bis zur Lösung erwärmt und dann das überschüssige Thionylchlorid unter stark vermindertem Druck bei etwa 40^0 verdampft. Der Rückstand wird sofort in der 20-fachen Menge Chloroform gelöst und mit einer Lösung von 1,6 g Tyrosinester (Schmp. 108^0 korr.) ebenfalls in Chloroform vermischt und schnell zum Sieden erhitzt. Verdampft man dann das Chloroform unter vermindertem Druck, so hinterbleibt eine gelbe, amorphe Masse, die man sofort in 15 ccm normaler Natronlauge löst. Diese Lösung bleibt 12 Stunden stehen, wird dann durch Schütteln mit Tierkohle größtenteils entfärbt und endlich mit Salzsäure übersättigt. Es fällt eine weiße, halbfeste Masse, die nach mehrstündigem Stehen bei 0^0 völlig erstarrt. Sie wird abgesogen und aus heißem Wasser unter nochmaligem Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Beim Erkalten scheidet sich die Verbindung in winzigen verfilzten Nädelchen aus. Diese schmelzen im Kapillarröhrchen bei 158^0 (korr. 161^0), nachdem sie bereits bei 153^0 gesintert sind. Durch weiteres Umkristallisieren aus sehr verdünntem Alkohol wird die Verbindung in beiderseitig spitzen Nadeln erhalten, welche kein Kristallwasser enthalten, bei 157—158^0 sintern und bei 163—163,5^0 (korr. 166—166,5^0) zu einem hellen Öl schmelzen.

---

[1]) Emil Fischer und Peter Bergell: Über die β-Naphtalinsulfoderivate der Aminosäuren. Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3779 [1902]. (*S. 197.*)

Zur Analyse wurden sie bei 80° getrocknet.

0,1832 g Sbst.: 0,3944 g CO_2, 0,0819 g H_2O. — 0,1587 g Sbst.: 9,0 ccm N (21°, 752 mm).

$C_{21}H_{20}N_2SO_6$. Ber. C 58,87, H 4,67, N 6,54.
Gef. „ 58,71, „ 4,96, „ 6,38.

Die Verbindung ist auch in heißem Wasser recht schwer löslich. Von Alkohol wird sie besonders in der Wärme leicht aufgenommen. In Äther und Chloroform ist sie schwer löslich. Aceton löst sie leicht schon bei gewöhnlicher Temperatur, Essigäther erst in der Hitze. Löslich in Ammoniak und verdünnten Alkalien, aus welchen sie durch Ansäuern gefällt wird.

Erhitzt man sie mit einer zur Lösung ungenügenden Menge Wassers, so schmilzt der Rest. Beim Hinzufügen von Millon's Reagens zur wässerigen Lösung entsteht sofort ein schwerlöslicher Niederschlag, der sich beim Kochen bald schwach rosa färbt, während die Flüssigkeit selbst nicht gefärbt ist. Die Anwesenheit von freiem Tyrosin ist demnach leicht festzustellen.

Die alkalische wie ammoniakalische Lösung drehen das polarisierte Licht nach rechts.

Die Ausbeute betrug bei der ersten Darstellung 62%, bei Verwendung größerer Substanzmengen (über 2 g Naphtalinsulfoglycin zur Chlorierung verwandt) 77% der Theorie.

Eine Bestimmung der optischen Konstante bei Natriumlicht gab $[\alpha]_D^{20} = +17,9$. 0,3430 g Substanz wurden in 3,5 ccm Normal-Natronlauge und Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Flüssigkeit = 6,7936 g, der Prozentgehalt mithin 5,05, das spez. Gewicht 1,0328, die Rechtsdrehung im 1-Dezimeterrohr = +0,935°.

Spaltung durch Pankreatin.

1,0 g β-Naphtalinsulfoglycyl-*l*-tyrosin vom Schmp. 162° (unkorr.) wurde mit 20 ccm Wasser übergossen, mit verdünntem Ammoniak bis zur völligen Lösung versetzt und 0,2 g Pankreatin (von der Firma Rhenania-Aachen) hinzugefügt. Nimmt man weniger Wasser, so scheidet sich das ziemlich schwer lösliche Ammoniumsalz als schleimige Masse aus. Schon nach einer Stunde, bei 36—37°, ist in der Flüssigkeit Tyrosin mittels der Millon'schen Reaktion nachzuweisen und nach 13 Stunden betrug die Menge des auskristallisierten, rohen Tyrosins 0,34 g, während eine Kontrollprobe, welche dieselbe Menge des Dipeptids in Ammoniak, aber ohne Zusatz des Enzyms, enthielt, völlig klar blieb. Ein zweiter Versuch gab noch etwas mehr, nämlich 0,389 g umkristallisiertes Tyrosin. Die vom Tyrosin abfiltrierte Flüssigkeit gab

beim weiteren Stehen keine Kristalle mehr. Sie wurde deshalb mit Salzsäure übersättigt, wobei sofort reines β-Naphtalinsulfoglycin vom Schmp. 159° (korr.) ausfiel. Seine Menge betrug 0,55 g (bei dem 2. Versuch 0,523 g), während theoretisch 0,618 g entstehen muß. Zur Analyse wurde das Produkt einmal aus verdünntem Alkohol umkristallisiert und bei 100° getrocknet.

0,1590 g Sbst.: 0,3163 g CO_2, 0,0606 g H_2O.

Ber. C 54,34, H 4,15.
Gef. „ 54,25, „ 4,22.

Das ausgeschiedene Tyrosin war nicht so rein. Es mußte erst verschiedentlich aus heißem Wasser umkristallisiert werden, bevor es nach dem Trocknen bei 110° folgende Zahlen gab:

0,1683 g Sbst.: 0,3659 g CO_2, 0,0926 g H_2O.

Ber. C 59,66, H 6,08.
Gef. „ 59,29, „ 6,12.

Die oben angegebene Menge des auskristallisierten rohen Tyrosins ist ungefähr 20% geringer als die Theorie. Der Verlust erklärt sich durch die ziemlich große Löslichkeit der Aminosäure in verdünnten Flüssigkeiten, die noch Fermente und andere Proteïnstoffe enthalten. Der Schmelzpunkt wurde bei 306° (korr. 314°) gefunden.

β-Naphtalinsulfoglycyl-*d l*-leucin.

$C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(COOH).CH_2.CH(CH_3)_2$.

4 g β-Naphtalinsulfoglycin werden mit Thionylchlorid in der üblichen Weise chloriert, in Chloroform gelöst und mit einer chloroformischen Lösung von 6 g *d l*-Leucinester vermischt. Es tritt lebhafte Reaktion ein, die mäßige Kühlung erfordert. Nach Verdampfen des Chloroforms im Vakuum kristallisiert der ganze Rückstand. Er wird sofort in 50 ccm Normal-Natronlauge gelöst. Die Lösung bleibt 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, wird dann mit Tierkohle entfärbt und mit Salzsäure übersättigt. Beim längeren Stehen bei 0° erstarrt die zuerst ölig fallende Substanz kristallinisch. Sie wird abgesogen, mit Wasser gewaschen und aus der 20-fachen Menge heißen 20-prozentigen Alkohols umkristallisiert. Beim langsamen Erkalten kristallisiert sie in mehrere Millimeter langen, zu Sternen gruppierten Nadeln, nur vereinzelt erscheinen lange, zugespitzte Blätter. Sie ist kristallwasserfrei. Im Kapillarröhrchen erhitzt, sintert sie bei 120° und schmilzt ziemlich scharf bei 123—123,7° (korr. 124,3—125°) zu einem hellen Öl.

Zur Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1931 g Sbst.: 0,4030 g CO_2, 0,1033 g H_2O. — 0,1839 g Sbst.: 11,9 ccm N (22°, 762 mm).

$C_{18}H_{22}N_2SO_5$. Ber. C 57,14, H 5,82, N 7,40.
Gef. „ 56,91, „ 5,94, „ 7,35.

Die Verbindung ist auch in heißem Wasser ziemlich schwer löslich. Von Alkohol wird sie schon in der Kälte leicht aufgenommen. In Äther löst sie sich wenig, leicht dagegen in Essigester.

Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 5,0 g oder ca. 87% der Theorie.

Die analoge Verbindung des *l*-Leucins wurde in gleicher Weise dargestellt, aber, wie die Analyse zeigt, nicht ganz rein erhalten. Sie fällt aus der alkalischen Lösung beim Ansäuern in der Kälte als weißes Öl, das sich schnell in lange, zugespitzte und zweigartig aneinander gelagerte Blätter verwandelt.

Sie wurde vorerst aus 60-prozentigem Alkohol umkristallisiert, woraus sie sich beim langsamen Erkalten in langen, rechteckigen Tafeln ausscheidet. Der Schmelzpunkt stieg auf 144—145° (unkorr.). Für die Analyse war bei 80° getrocknet.

0,1815 g Sbst.: 0,3746 g CO_2, 0,0983 g H_2O. — 0,1912 g Sbst.: 12,0 ccm N (20°, 756 mm).

Ber. C 57,14, H 5,82, N 7,40.
Gef. „ 56,29, „ 6,01, „ 7,14.

Es gelang nicht, durch weiteres Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol die Substanz analysenrein zu erhalten. Die beschriebenen Kristalle zeigten eine spezifische Drehung von ca. +13.

Die Säure wurde ebenso wie der zuvor beschriebene Racemkörper einer mehrtägigen Pankreatinwirkung ausgesetzt. In beiden Fällen war keine rasche Einwirkung des Enzyms wahrnehmbar. Ob aber nicht doch eine ganz langsame Hydrolyse eintritt, müssen wir unentschieden lassen.

Carbäthoxylglycyl-*dl*-leucin,

$C_2H_5.COO.NH.CH_2.CO.NH.CH(COOH).CH_2.CH(CH_3)_2$.

11 g Carbäthoxylglycin werden mit Thionylchlorid chloriert, in 110 ccm Äther gelöst und zu einer Lösung von 22 g inaktivem Leucinester in 80 ccm Äther hinzugefügt. Das Gemisch erwärmt sich. Nach einiger Zeit wird von ausgeschiedenem salzsauren Leucinester abfiltriert, das Filtrat eingeengt, mit wenig Wasser gewaschen und völlig eingedampft. Der ölige Rückstand war nicht zur Kristallisation zu bringen. Er ist leicht löslich in Äther, Alkohol, Aceton, schwer löslich in Petrol-

äther, ebenso in Wasser. Zur Verseifung wurde daher der Ester, dessen Menge 19 g betrug, mit 67 ccm Normal-Natronlauge (auf 1,1 Mol. berechnet) übergossen, wobei bald völlige Lösung erfolgte. Beim Neutralisieren schied sich die neue Säure zuerst ölig aus, kristallisierte aber bald. Die Ausbeute betrug 9 g und stieg durch Verarbeitung der Mutterlauge noch um 1 g. Die Säure wurde aus der 9-fachen Menge heißem Wasser, darauf nochmals aus verdünntem Alkohol umkristallisiert und zur Analyse im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Schmp. 134 bis 135° (135,5—136,5 korr.). Kristallform: aus Aceton Tafeln, aus Alkohol und Wasser Nadeln.

0,1707 g Sbst.: 0,3167 g CO_2, 0,1194 g H_2O. — 0,1757 g Sbst.: 16,6 ccm N (21°, 761 mm).

Ber. C 50,77, H 7,69, N 10,77.
Gef. „ 50,60, „ 7,85, „ 10,78.

Die Verbindung löst sich in ungefähr der 9-fachen Menge heißem und in ca. der 100-fachen Menge kaltem Wasser; sie ist leicht löslich in Aceton und Alkohol, wenig in Äther, schwer in Chloroform, kaum löslich in Petroläther und Benzol.

Einwirkung von Pankreatin auf Carbäthoxylglycyl-*dl*-Leucin.

1,5 g wurden in 15 ccm Wasser und 0,7 g trocknem Natriumcarbonat gelöst, dann 0,3 g Pankreatin und etwas Toluol zugesetzt und das Gemisch 5 Tage bei 36° aufbewahrt. Anfänglich drehte die Lösung wegen des Gehaltes an Pankreatin nach links. Zum Schlusse aber war sie aller Wahrscheinlichkeit nach infolge der eingetretenen asymmetrischen Hydrolyse rechts drehend. Als die Flüssigkeit dann filtriert und mit Salzsäure angesäuert wurde, entstand bald ein kristallinischer Niederschlag, dessen Menge nach mehrstündigem Stehen 0,3 g betrug. Dieses Produkt ist z. T. unveränderter Racemkörper, der sich daraus durch Umkristallisieren in reiner Form erhalten läßt. Das salzsaure Filtrat, welches das polarisierte Licht nach rechts drehte, wurde mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Beim Verdampfen des Äthers blieb ein Sirup, der nach einigen Stunden partiell kristallisierte. Dieses Produkt drehte in alkalischer Lösung nach rechts, und wir glauben, daß es z. T. wenigstens das der Hydrolyse entgangene Carbäthoxylglycyl-*d*-leucin war. Um aus der salzsauren Lösung das bei der Hydrolyse frei werdende *l*-Leucin zu isolieren, bedienten wir uns wieder der β-Naphtalinsulfoverbindung, wovon 0,69 g erhalten wurden. Für die Analyse wurde das Präparat aus sehr verdünntem Alkohol umkristallisiert. Es zeigte dann alle Eigenschaften des früher beschriebenen β-Naphtalinsulfo-*l*-leucin.

Die kristallwasserhaltige Substanz sinterte gegen 60° und schmolz bei 68—69°. Sie verlor beim Trocknen im Vakuum zwischen 60 und 75° ein Molekül Kristallwasser.

0,2420 g Sbst. verloren 0,0134 g H_2O.

Ber. H_2O 5,40. Gef. H_2O 5,53.

Die kristallwasserfreie Verbindung schmolz bei 98°. Zur Analyse diente die kristallwasserhaltige Substanz.

0,1780 g Sbst.: 0,3679 g CO_2, 0,0979 g H_2O.

Ber. C 56,63, H 6,19.
Gef. „ 56,37, „ 6,11.

Auch die optische Untersuchung ergab eine annähernde Übereinstimmung, wie folgende Daten zeigen.

0,3052 g der wasserhaltigen Verbindung von dem Pankreatinversuch wurden in 3 ccm Normal-Natronlauge und Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 5,0336 g, Prozentgehalt demnach 6,63. Die Lösung dreht 3,02° links bei weißem Licht. Spez. Gewicht 1,0384. Daraus berechnet sich eine spezifische Drehung von —43,86°.

Zum Vergleich diente ein β-Naphtalinsulfo-*l*-leucin, das von einem Leucin aus Horn hergestellt war, dessen spezifische Drehung in 21-prozentiger Salzsäure $[\alpha]_{20}^{D} = +17,1^{0}$ betrug.

0,4276 g wurden in 4 ccm *n*-Natronlauge und Wasser gelöst.

Gewicht der Lösung 5,759 g, mithin 7,42 %. Spez. Gewicht 1,0452. Die Lösung drehte 3,76° nach links bei weißem Licht. Daraus berechnet sich eine spezifische Drehung von —48,48°.

Völlige Übereinstimmung dieses Wertes mit dem ersten war nicht zu erwarten, denn man weiß jetzt, daß es kaum möglich ist, aus den Proteïnstoffen ein reines aktives Leucin zu bereiten.

Carbäthoxylglycyl-Tyrosin.

2,7 g Carbäthoxylglycin werden mit Thionylchlorid behandelt und der beim Verdampfen des Thionylchlorids bleibende Rückstand in ätherischer Lösung mit 7,1 g Tyrosinester in chloroformischer Lösung zusammengebracht. Man erwärmt einige Zeit auf 40°, filtriert vom salzsauren Tyrosinester und verdampft die Lösung unter vermindertem Druck. Es hinterbleibt ein Sirup, der nicht kristallisiert. Zur Verseifung wird der Ester in 2 Mol. norm. Natronlauge gelöst und 6 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt. Darauf wird die dem Alkali entsprechende Menge Salzsäure zugefügt, wobei kein Niederschlag erfolgt, im Vakuum bei 40° verdampft und die organische Säure durch heißes Aceton vom Kochsalz getrennt. Beim Verdampfen des Acetons bleibt ein Sirup, der auch beim längeren Stehen nicht kristallisiert. Er

ist in Alkohol und Aceton besonders in der Wärme leicht löslich, schwer löslich in Äther. Beim Lösen in verdünnter Sodalösung entweicht Kohlensäure. Der Sirup wurde in schwach alkalischer Lösung der Pankreatinspaltung bei 36° ausgesetzt. Bereits nach 45 Minuten trat Kristallisation von Tyrosin ein, während die Kontrollproben auch bei tagelangem Stehen im Brutschrank klar blieben. Nach 12 Stunden wurde der Verdauungsversuch abgebrochen. Das rohe Tyrosin zeigt den Schmp. 304° (korr. 312°), mußte jedoch mehrfach umkristallisiert werden, bevor es die richtige Zusammensetzung zeigte. Das Filtrat wurde nach dem Ansäuern mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherischen Auszüge hinterließen einen Siiup, der nach 12-stündigem Stehen spontan, sofort beim Impfen mit einem Kriställchen Carbäthoxylglycin kristallisierte. Die abgepreßten Kristalle (ca. 1 g) sinterten bei 68° und schmolzen wie Carbäthoxylglycin bei 75° (korr.).

Zur Analyse wurden sie im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1738 g Sbst.: 0,2618 g CO_2, 0,0938 g H_2O.

$C_5H_9NO_4$. Ber. C 40,81, H 6,12.
Gef. „ 41,1, „ 5,93.

Das Tyrosin gab folgende Zahlen:

0,1769 g Sbst.: 0,3830 g CO_2, 0,0938 g H_2O.

Ber. C 59,66, H 6,08.
Gef. „ 59,05, „ 5,89.

Um andere tyrosinhaltige Dipeptide synthetisch zu bereiten, haben wir noch versucht, die Naphtalinsulfoverbindung des Tyrosins selbst zu gewinnen. Dabei hat sich aber gezeigt, daß die Aminosäure in alkalischer Lösung mit 2 Mol. Naphtalinsulfochlorid reagiert und ein Produkt liefert, das die Millon'sche Probe nicht mehr zeigt, mithin kein Phenolhydroxyl mehr enthält. Die Verhältnisse liegen also hier genau so wie bei der Benzoylierung des Tyrosins, wo ebenfalls eine Dibenzoylverbindung resultiert, die zuerst von dem einen von uns[1]) kurz beschrieben und später von A. Schultze[2]) ausführlich untersucht worden ist.

Di-β-naphtalinsulfotyrosin,

$C_{10}H_7.SO_2.O.C_6H_4.CH_2.CH(COOH).NH.SO_2.C_{10}H_7$.

Schüttelt man die alkalische Lösung von Tyrosin mit einer ätherischen Lösung von β-Naphtalinsulfochlorid im Überschuß, so scheidet sich bald ein weißer, flockiger Niederschlag in reichlicher Menge ab. Nach 2 Stunden wird filtriert und der Niederschlag aus heißem Wasser umkristallisiert. Die Verbindung kristallisiert in Nadeln und ist das

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2454 [1899]. (*S. 90.*)
[2]) Zeitschr. für physiol. Chem. **29**, 479 [1900].

Natriumsalz des Dinaphtalinsulfotyrosins. 3,5 g Tyrosin gaben 9 g des Derivates, mithin ungefähr 80% der Theorie. Die Substanz ist in heißem Wasser ziemlich leicht löslich (1 : 50 umkristallisiert), schwer löslich in kaltem. Verdünnter Methylalkohol löst sie gleichfalls in der Wärme und bei langsamem Erkalten scheiden sich mehrere Millimeter lange Nadeln ab. Alkohol löst diese sehr schwer. In Äther, Benzol, Essigäther ist das Salz unlöslich.

Im Kapillarröhrchen erhitzt, sintert es bei 250°, schmilzt bei 252—254° unter Schäumen. Es ist kristallwasserfrei und wurde zur Analyse bei 110° getrocknet.

0,1948 g Sbst.: 0,4260 g CO_2, 0,0717 g H_2O. — 0,2103 g Sbst.: 4,6 ccm N (20°, 751 mm). — 0,1442 g Sbst.: 0,0166 g Na_2SO_4. — 0,1866 g Sbst.: 0,1560 g $BaSO_4$.

$C_{29}H_{22}O_7NS_2Na$. Ber. C 59,69, H 3,77, N 2,40, Na 3,94, S 10,97.
Gef. „ 59,64, „ 4,09, „ 2,47, „ 3,73, „ 11,47.

Die Verbindung gibt die Millon'sche Reaktion nicht.

Die freie Säure wurde aus der wässerigen Lösung des Natriumsalzes durch Salzsäure als farbloser, voluminöser Niederschlag gefällt. Sie ist selbst in heißem Wasser sehr schwer löslich, in heißem Alkohol dagegen ziemlich leicht löslich. Aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, bildet sie mikroskopische, eng zu Rosetten gelagerte Nädelchen. Beim langsamen Erkalten entstehen größere, zu traubenförmigen Gebilden und Büscheln verwachsene Blättchen. Die Substanz zeigt, im Kapillarröhrchen erhitzt, keinen scharfen Schmelzpunkt. Sie bildet bei 100—102° ein zähes Öl, welches erst über 120° flüssig wird. Über 145—150° erhitzt, schäumt dasselbe auf, zersetzt sich jedoch dabei nicht.

Das Ammoniumsalz wurde dargestellt durch Lösen der freien Säure in heißem, verdünntem Ammoniak. Beim Abkühlen kristallisieren feine, zweigartig verwachsene, mehrere Millimeter lange Nadeln.

Das Baryumsalz ist auch in heißem Wasser schwer löslich.

Die freie Säure wurde zur Analyse bei 80° getrocknet.

0,1571 g Sbst.: 0,3561 g CO_2, 0,0638 g H_2O.

$C_{29}H_{23}S_2NO_7$. Ber. C 62,03, H 4,09.
Gef. „ 61,82, „ 4,51.

Di-β-naphtalinsulfotyrosyl-*dl*-leucin,

$C_{10}H_7.SO_2.O.C_6H_4.CH_2.CH.(NH.SO_2.C_{10}H_7)CO.NH.CH.(COOH)$
$.CH_2.CH_2(CH_3)_2$.

2 g Di-β-naphtalinsulfotyrosinnatrium werden mit Thionylchlorid übergossen. Es tritt sofort Reaktion ein. Geringes Erwärmen genügt zur völligen Lösung. Beim Verdampfen unter stark vermindertem

Druck hinterbleibt eine helle, amorphe, in Chloroform leicht lösliche Masse. Mit einer chloroformischen Lösung von 1,3 g Leucinester tritt sofort Reaktion ein, die man unter mäßiger Kühlung verlaufen läßt. Die rötliche, klare Lösung hinterläßt beim Verdampfen im Vakuum eine stark blähende, fast weiße Masse. Sie wird in wenig Alkohol gelöst und in viel sehr verdünnte Natronlauge (enthaltend 20 ccm *n*-Natronlauge) eingegossen. Nach mehrstündigem Stehen wird mit Salzsäure angesäuert, wobei ein helles Öl ausfällt, das bei längerem Stehen bei 0° fest wird. Dieses Produkt wird abgesogen, in heißem Alkohol gelöst, mit Tierkohle behandelt, auf 0° abgekühlt und durch Wasser gefällt. Es fällt dabei als Öl, welches allmählich kristallisiert. Durch Wiederholung der Operation erhält man die Substanz in kleinen, zu Sternen gruppierten Nädelchen, welche keinen scharfen Schmelzpunkt zeigen. Im Kapillarröhrchen erhitzt, sintern sie bei 90° und schmelzen unscharf von 100—105°. Zur Analyse wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1677 g Sbst.: 0,3844 g CO_2, 0,0812 g H_2O. — 0,2131 g Sbst.: 7,0 ccm N (16°, 753 mm).

$C_{35}H_{34}N_2O_8S_2$. Ber. C 62,41, H 5,05, N 4,02.
Gef. „ 62,51, „ 5,38, „ 3,80.

Die Verbindung ist auch in heißem Wasser sehr schwer löslich. Leicht löslich in kaltem Alkohol, schwer in Äther. Von Essigäther, Aceton und Chloroform wird sie schon in der Kälte leicht aufgenommen.

Mehrtägige Einwirkung von Pankreatin in alkalischer Lösung ließ die Substanz unverändert.

Nach Abschluß vorstehender Abhandlung kam uns die Arbeit von M. Schwarzschild[1]) „Über die Wirkungsweise des Trypsins“ zu Gesicht. Derselbe beobachtete, daß im Gegensatz zu einer Reihe gewöhnlicher Amide eine von Curtius entdeckte und „Biuretbase“ genannte Substanz bei der Behandlung mit Trypsin nicht allein die Biuretreaktion verliert, sondern auch Glykocoll liefert. Er glaubt ferner, diese Curtius'sche Base als ein kompliziertes Polypeptid des Glykocolls betrachten zu dürfen und sieht in der Spaltung mit Trypsin einen ganz analogen Vorgang mit der Hydrolyse der Proteïnstoffe. So interessant diese Beobachtungen auch sind, so müssen wir doch darauf aufmerksam machen, daß die Natur der Curtius'schen Base keineswegs aufgeklärt ist und daß sie sich von den anderen synthetischen Polypeptiden in ihren Metamorphosen wesentlich unterscheidet. Denn nach den Mitteilungen von Curtius und Goebel[2]) wird sie schon

[1]) Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, IV. Band, 155, Juni 1903.

[2]) Journ. für prakt. Chem. 37, 170 [1888]. (*S. 197.*)

durch wiederholtes Umkristallisieren aus Wasser oder noch viel rascher auf Zusatz von Salzsäure oder Platinchlorid, oder sogar durch Kochen mit frisch gefälltem Kupferoxyd zersetzt und liefert neben Glycinanhydrid eine gallertige, sehr schwerlösliche Substanz, die wie Leim zusammenschrumpft. Daß eine derartige, höchst empfindliche Substanz mit den Proteïnstoffen oder Peptonen analog konstituiert ist, halten wir nicht einmal für wahrscheinlich. Jedenfalls ist die Struktur derselben nichts weniger als aufgeklärt und da das Glycylglycin, wie wir oben nachgewiesen haben, durch Trypsin nicht gespalten wird, so spricht gerade dieser Gegensatz mehr für eine strukturelle Verschiedenheit zwischen den Polypeptiden und der Curtius'schen Base.

---

40. Emil Fischer und Peter Bergell: Spaltung einiger Dipeptide durch Pankreasferment.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **37**, 3103 (1904).
(Eingegangen am 5. August.)

Vor einem Jahre[1]) haben wir gezeigt, daß die Naphtalinsulfo- und Carbäthoxylderivate des Glycyltyrosins und des Glycylleucins durch Pankreasferment hydrolysiert werden. Nachdem die freien Polypeptide durch die neuen synthetischen Methoden in größerer Zahl zugänglich geworden waren, lag es nahe, ihr Verhalten gegen das Enzym ebenfalls zu studieren. Mit positivem Erfolge haben wir das bei dem Glycyl-*l*-tyrosin und dem inaktiven Leucyl-alanin getan. Bei dem ersten ist die Hydrolyse am leichtesten zu beobachten, weil das Tyrosin auskristallisiert. Da das Glycyl-*l*-tyrosin in stereochemischer Beziehung einheitlich sein muß, so war eine gleichmäßige und schließlich vollständige Hydrolyse durch das Enzym zu erwarten. In Wirklichkeit haben wir aber nicht die theoretische Menge von Tyrosin erhalten können. Wir werden auf diesen Punkt später zurückkommen. Das andere Dipeptid ist racemisch, und man durfte deshalb bei ihm eine asymmetrische Wirkung des Enzyms erwarten, wie wir sie früher beim Carbäthoxylglycyl-*d l*-leucin beobachtet haben. Das ist in der Tat der Fall. Als Spaltungsprodukte des Leucyl-alanins konnten wir *l*-Leucin und *d*-Alanin sicher nachweisen und die Bildung von aktivem Dipeptid sehr wahrscheinlich machen.

Spaltung des Glycyl-*l*-tyrosins.

Für den Versuch diente ein möglichst reines Präparat, das nach der kürzlich mitgeteilten Vorschrift[2]) mit Anwendung von natürlichem *l*-Tyrosin dargestellt war. 1 g des Präparates wurde in 20 ccm Wasser gelöst und diese Lösung, die im 1-Dezimeterrohr 1,87^0 nach rechts drehte, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht. Von der Flüssigkeit diente 1 ccm als Kontrollprobe. Der übrige Teil wurde mit 0,2 g

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2592 [1903]. (*S. 580, 583.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2495 [1904]. (*S. 346.*)

käuflichem Trypsin (Pankreatin von der Firma Rhenania) versetzt, tüchtig geschüttelt, wobei ein Teil des Enzyms in Lösung ging, und filtriert. Die Flüssigkeit drehte jetzt im 1-Dezimeterrohr nur noch +1,6°. Sie wurde nach Zugabe von Toluol zugleich mit der Kontrollprobe im Brutschrank bei 36° aufbewahrt. Nach 12 Stunden war in der mit Enzym versetzten Flüssigkeit Tyrosin als ziemlich dicker Kristallbrei abgeschieden, der sich in den nächsten 30 Stunden noch sichtlich vermehrte. Nach 6 Tagen wurde das Tyrosin abfiltriert. Seine Menge betrug 0,25 g. Die Drehung des Filtrates war auf +0,55° zurückgegangen. Die Kontrollprobe zeigte sich unverändert. Die filtrierte Flüssigkeit wurde von neuem mit 0,1 g Pankreatin versetzt, geschüttelt, filtriert und wieder 24 Stunden bei 36° gehalten. Es fand abermals Abscheidung von Tyrosin statt, dessen Menge nach 24-stündigem Stehen im Eisschrank 0,12 g betrug. Die Gesamtmenge des Tyrosins war also 0,37 g, während für 1 g Ausgangsmaterial nach Abzug der Kontrollprobe 0,72 g sich berechnen, so daß die Ausbeute etwas mehr als 50% war. Wahrscheinlich wird man sie bei weiterem Zusatz von Enzym noch erhöhen können, aber die theoretische Menge zu erreichen, dürfte kaum möglich sein, da ein Teil des Tyrosins durch die mit dem Enzym eingeführten Fremdstoffe in Lösung gehalten wird. Es ist deshalb schwer zu prüfen, wie weit die Hydrolyse geführt werden kann. Zur Reinigung wurde das Tyrosin einmal in verdünnter Salzsäure gelöst, durch Ammoniak wieder abgeschieden, dann aus heißem Wasser umgelöst und bei 100° getrocknet.

0,1808 g Sbst.: 0,3924 g CO_2, 0,0980 g H_2O.

Ber. C 59,66, H 6,08.
Gef. „ 59,20, „ 6,00.

Das Präparat schmolz unter partieller Zersetzung bei 313—314° (korr.).

Zum Nachweis des gleichzeitig entstehenden Glykocolls wurde die vom Tyrosin abfiltrierte Mutterlauge mit 4 ccm Normal-Natronlauge und einer ätherischen Lösung von 3 g β-Naphtalinsulfochlorid versetzt und dann so verfahren, wie es früher[1]) für die Bereitung der β-Naphtalinsulfoderivate von Aminosäuren empfohlen wurde. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung fiel das β-Naphtalinsulfoglycin zunächst als Öl aus, das auch beim längeren Stehen nicht kristallisierte. Es wurde deshalb mit 30 ccm Wasser ausgekocht; aus dem Filtrat fiel dann die Verbindung beim Abkühlen kristallinisch aus, zeigte aber zunächst noch einen etwas zu niedrigen Schmelzpunkt. Dieser stieg nach

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3780 [1902]. (*S. 197.*)

einmaligem Umkristallisieren aus sehr verdünntem Alkohol auf 159° (korr.), wie früher angegeben, und die Analyse des bei 100° getrockneten Produktes gab auch auf Naphtalinsulfoglycin stimmende Zahlen:

0,1736 g Sbst.: 0,3465 g CO_2, 0,0652 g H_2O.

Ber. C 54,34, H 4,15.

Gef. „ 54,40, „ 4,20.

Bei einem zweiten Versuch mit 0,75 g Glycyl-tyrosin, bei dem das Enzym in drei Portionen von je 0,1 g zugegeben war, verlief die Spaltung unter ähnlichen Erscheinungen, und die Menge des Tyrosins betrug nach der Reinigung mit Salzsäure und Ammoniak 0,31 g oder 55% der Theorie.

Spaltung des Leucyl-alanins.

Das bisher nicht beschriebene Dipeptid wurde von Herrn O. Warburg im hiesigen Institut aus racemischem Alanin und inaktivem Bromisocapronylchlorid dargestellt. Es ist ein gut kristallisierter Stoff, der unter Zersetzung gegen 245° schmilzt und dem äußeren Anschein nach einheitlich ist, vielleicht aber doch noch ein Gemisch von zwei stereoisomeren Racemkörpern bildet.

4 g wurden in 110 ccm Wasser und einigen Tropfen Ammoniak unter gelindem Erwärmen gelöst, nach dem Abkühlen mit 0,8 g Pankreatin tüchtig geschüttelt und von dem nicht gelösten Teil des Enzyms abfiltriert. Diese Flüssigkeit, die im 1-Dezimeterrohr 0,41° nach links drehte, wurde nach Zusatz von Toluol drei Tage bei 36° aufbewahrt, wobei die Linksdrehung auf −0,73° stieg, dann wurden noch 0,3 g Enzym zugegeben und nach dem Schütteln wieder filtriert. Die Drehung der Lösung, die jetzt −0,76° betrug, ging in den nächsten Tagen bei 36° noch auf −0,83° hinauf. Nachdem die Wirkung des Enzyms im ganzen 8 Tage gedauert hatte, wurde die Flüssigkeit zur Isolierung der Produkte zunächst in einer Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und der Rückstand mit 5 ccm Wasser, das auf 0° abgekühlt war, sorgfältig ausgelaugt. Der ungelöste Teil betrug 2,2 g. Die Verarbeitung der Mutterlauge, die mit A bezeichnet sei, wird später beschrieben. Der ungelöste Teil enthielt aktives Leucin neben unverändertem Dipeptid und anderen Produkten. Für die Isolierung des Leucins diente das schwer lösliche Kupfersalz. Zu seiner Bereitung wurde die ganze Masse in viel Wasser gelöst und etwa 1 Stunde mit überschüssigem Kupferoxyd auf dem Wasserbade unter häufigem Umschütteln digeriert. Die heiß filtrierte Lösung gab dann beim Einengen unter vermindertem Druck ein schwer lösliches Kupfersalz, das zunächst noch keine deutliche Kristallform zeigte. Als aber die Kristalli-

sation aus heißem Wasser wiederholt wurde, entstanden die blaßblauen Blättchen, wie sie dem Leucinkupfer eigentümlich sind. Die Ausbeute an reinem Salz betrug allerdings nur 0,35 g, jedenfalls war aber die Menge des Leucins erheblich größer, denn die Trennung der Aminosäure von den Polypeptiden mit Hilfe des Kupfersalzes ist nichts weniger als quantitativ. Das Leucinkupfer gab folgende Zahlen:

0,0852 g Sbst.: 0,021 g CuO.

$(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$. Ber. Cu 19,6. Gef. Cu 19,6.

Der Rest des Kupfersalzes diente zur Bereitung der freien Aminosäure. Diese glich in Kristallform, Geschmack, Löslichkeit ganz dem natürlichen Leucin, insbesondere drehte sie in salzsaurer Lösung nach rechts. Eine Lösung in 20-prozentiger Salzsäure, die 3,14% der Aminosäure enthielt, drehte im 1-Dezimeterrohr bei Natriumlicht 0,40^0 nach rechts und hatte das spez. Gewicht 1,10, daraus berechnet sich $[\alpha]_D^{20^0}$ $+11,6^0$. Die spezifische Drehung betrug mithin nur $^2/_3$ des Wertes, der für reinstes Leucin beobachtet wurde. Das aus dem Dipeptid gebildete Leucin bestand mithin zu etwa 83% aus *l*-Verbindung und 17% *d*-Verbindung; daraus geht zweifellos hervor, daß die Wirkung des Enzyms asymmetrisch erfolgt und vorzugsweise das natürliche *l*-Leucin liefert. Ob die kleine Menge *d*-Leucin auch durch den enzymatischen Prozeß oder durch teilweise Racemisation bei der Isolierung entstanden ist, müssen wir unentschieden lassen. Aus dem löslichen Teil des Kupfersalzes konnte noch unangegriffenes, inaktives Dipeptid gewonnen werden.

Der in eiskaltem Wasser lösliche Teil des ursprünglichen Reaktionsproduktes (Mutterlauge A) enthielt *d*-Alanin und ein aktives Dipeptid, dessen Trennung und Nachweis allerdings ziemlich schwierig war. Die Lösung wurde zunächst wieder in einer Platinschale zur Trockne verdampft und nochmals mit 6 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt, wobei ein geringer, amorpher und nicht weiter untersuchter Rückstand blieb. Die wässerige Lösung gab auf Zusatz von viel absolutem Alkohol einen festen, nicht deutlich kristallisierten Niederschlag (1 g). Er wurde zur Entfernung von peptonartigen Produkten mit 90-prozentigem Alkohol ausgekocht, und die von einem schmierigen Rückstand getrennte Lösung mit dem ersten wässerig-alkoholischen Filtrat vereinigt. Beim Verdampfen dieser Lösung in einer Platinschale hinterblieb ein zum Teil kristallinischer, zum Teil sirupöser Rückstand. Er wurde zwischen Fließpapier stark gepreßt. Die kristallinische Masse zeigte dann keine Biuretreaktion mehr, enthielt also nichts mehr von den Stoffen, die mit dem Enzym in die Lösung eingeführt waren. Sie schmeckte bitter, war bei 200^0 schon völlig geschmolzen und zeigte, in Normal-Salzsäure gelöst, eine spezifische Drehung von ungefähr 58^0 nach links. Sie wurde

in der gewöhnlichen Weise in die β-Naphtalinsulfoverbindung verwandelt. Diese kristallisierte aus verdünntem Alkohol in langen, seidenglänzenden Nadeln, die bei 151° schmolzen und, in Normal-Natronlauge gelöst, schwach nach rechts drehten. Eine Lösung vom Prozentgehalt 4,42 in Normal-Natronlauge drehte im 1-Dezimeterrohr Natriumlicht +1,74°, woraus sich berechnet $[\alpha]_D$ ungefähr +38°. Allerdings hat die Analyse Werte ergeben, die nur annähernd mit den für Naphtalinsulfoleucyl-alanin berechneten übereinstimmen.

0,1417 g Sbst.: 0,2929 g CO_2, 0,0874 g H_2O. — 0,1892 g Sbst.: 11,4 ccm N (21°, 760 mm).

$C_{19}H_{24}O_5N_2S$. Ber. C 58,2, H 6,1, N 7,2.
Gef. „ 56,4, „ 6,8, „ 6,9.

Leider reichte unser Material nicht zur Wiederholung der Reinigung und der Analyse aus. Der beim Abpressen des aktiven Leucyl-alanins vom Papier aufgenommene Sirup enthielt das *d*-Alanin. Es wurde mit Wasser ausgelaugt, die Flüssigkeit verdampft und der Rückstand in der üblichen Weise in die Naphtalinsulfoverbindung verwandelt. Aus der alkalischen Lösung gefällt, wurde diese nach einiger Zeit kristallinisch. Zur Reinigung diente das schwer lösliche Baryumsalz. Es schied sich aus, als die Säure in der gerade ausreichenden Menge Ammoniak gelöst und mit Baryumchlorid versetzt wurde. Die aus dem Baryumsalz regenerierte Säure verhielt sich ganz ähnlich wie das früher beschriebene β-Naphtalinsulfo-*d*-alanin[1]). Aus Wasser kristallisiert, enthielt sie Kristallwasser und schmolz infolgedessen schon bei 80°. Nachdem sie aber bei 60° im Vakuum getrocknet war, lag der Schmp. bei 125°. Eine Stickstoffbestimmung der trocknen Säure gab einen hinreichend stimmenden Wert.

0,1816 g Sbst.: 8,4 ccm N (23°, 760 mm).

Ber. N 5,0. Gef. N 5,2.

Die alkalische Lösung der Säure drehte stark nach links; es handelt sich demnach um das Derivat des natürlichen *d*-Alanins.

Wir haben ferner das ebenfalls von O. Warburg dargestellte inaktive Alanylleucin, und endlich das Leucylleucin in derselben Weise geprüft und in beiden Fällen auch die Anzeichen einer asymmetrischen Hydrolyse beobachtet. Da aber die Spaltung hier recht unvollkommen und infolgedessen die Isolierung der Produkte noch schwieriger war als im vorhergehenden Fall, so können die Versuche nicht als abgeschlossen betrachtet werden.

Man wird überhaupt aus der vorhergehenden Schilderung die Überzeugung gewinnen, daß namentlich die quantitative Verfolgung

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3781 [1902]. (*S. 199.*)

der Hydrolyse von Polypeptiden durch Pankreasenzym äußerst mühsam ist. Wir schreiben das zum großen Teil der mangelhaften Qualität des Enzyms zu. Bei seiner Gewinnung aus der Pankreasdrüse kommen Zersetzungsprodukte der Proteïnstoffe in Lösung, die dem gefällten Enzym beigemengt bleiben. Sie bestehen aus peptonartigen Produkten und erschweren sehr die Isolierung der durch den enzymatischen Prozeß gebildeten Aminosäuren. Will man auf diesem Gebiete eine größere Reihe von Untersuchungen machen, so ist ein wirksameres Enzym notwendig. Wir beabsichtigen deshalb, in Zukunft das frische Sekret der Pankreasdrüse, wie es durch Anlage einer Pankreasfistel bei Hunden gewonnen werden kann, zu benutzen, denn wir müssen auf diese Versuche großen Wert legen, weil die Wirkung der pankreatischen Enzyme vor der Hand das beste Mittel zu sein scheint, um aus der großen Zahl der künstlichen Polypeptide die biologisch wertvollen Kombinationen auszuwählen.

---

41. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft.[1])

Zeitschrift für physiologische Chemie 46, 52 (1905).
(Eingegangen am 10. August.)

Nach Beobachtungen von E. Fischer und P. Bergell[2]) zeigen die künstlichen Dipeptide gegenüber den Fermenten, die aus toter Pankreasdrüse extrahiert und unter dem Namen Trypsin oder Pankreatin in den Handel gebracht werden, scharfe Unterschiede. Die einen, wie Glycyl-glycin, werden nicht in nachweisbarer Menge angegriffen, während andere, wie das Glycyl-*l*-tyrosin, eine rasche Spaltung in die Komponenten erfahren. Besonders interessant gestaltete sich der Versuch beim racemischen Leucyl-alanin; denn die Hydrolyse erfolgt hier asymmetrisch, d. h. sie beschränkt sich auf die eine optisch-aktive Komponente des Racemkörpers. Die Ausdehnung dieser Untersuchungen auf die komplizierteren Polypeptide wurde damals durch die schlechte Beschaffenheit des käuflichen Pankreasfermentes und die dadurch bedingte Schwierigkeit, die Produkte der Hydrolyse zu isolieren, verhindert.

Durch die Güte des Herrn Prof. Pawlow in St. Petersburg sind wir inzwischen in den Besitz von reinem Pankreassaft gelangt, der von Hunden mittels einer Pankreasfistel entnommen war. Wir haben mit Hilfe dieses überaus wirksamen Fermentes eine ganze Reihe von Polypeptiden geprüft und fassen die Resultate in folgende Übersicht zusammen:

Hydrolysierbar.	Nicht hydrolysierbar.
* Alanyl-glycin.	Glycyl-alanin.
* Alanyl-alanin.	Glycyl-glycin.

[1]) Diese Mitteilung ist eine wesentliche Erweiterung der Abhandlung, welche wir am 23. Februar dieses Jahres der Akademie der Wissenschaften in Berlin vorlegten (Sitzungsberichte 1905, S. 290 u. Chemisches Centralblatt, 1905, Bd. 1, 923), denn die Zahl der untersuchten Polypeptide ist von 12 auf 29 gestiegen, und die Versuche mit Magensaft sind dazu gekommen.

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 36, 2592 [1903] u. 37, 3103. (*S. 589.*)

Hydrolysierbar.	Nicht hydrolysierbar.
* Alanyl-leucin A.	Alanyl-leucin B.
* Leucyl-isoserin A.	Leucyl-alanin.
Glycyl-*l*-tyrosin.	Leucyl-glycin.
Leucyl-*l*-tyrosin.	Leucyl-leucin.
* Alanyl-glycyl-glycin.	Aminobutyryl-glycin.
* Leucyl-glycyl-glycin.	Aminobutyryl-aminobuttersäure A.
* Glycyl-leucyl-alanin.	Aminobutyryl-aminobuttersäure B.
* Alanyl-leucyl-glycin.	Aminoisovaleryl-glycin.
Dialanyl-cystin.	Glycyl-phenylalanin.
Dileucyl-cystin.	Leucyl-prolin.
Tetraglycyl-glycin.	Diglycyl-glycin.
Triglycyl-glycinester (Curtius' Biuretbase).	Triglycyl-glycin.
	Dileucyl-glycyl-glycin.

Wie der Vergleich zwischen den beiden Reihen ergibt, ist der Angriff des Pankreasfermentes durch recht verschiedene Ursachen bedingt. Wir heben folgende Punkte hervor.

1. Einfluß der Struktur.

Alanyl-glycin $CH_3.CH(NH_2).CO.NH.CH_2.COOH$ wird gespalten, während das isomere Glycyl-alanin

$$NH_2.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).COOH$$

indifferent ist. Wahrscheinlich gehört hierhin noch der Gegensatz zwischen Alanyl-leucin A und Leucyl-alanin, vorausgesetzt, daß dieser Fall nicht durch sterische Verschiedenheit bedingt ist.

2. Einfluß der einzelnen Aminosäuren.

Bei den Dipeptiden, bei denen die Verhältnisse am einfachsten liegen, wird die Hydrolyse befördert, wenn Alanin als Acyl fungiert, wie der Hinweis auf Alanyl-glycin, Alanyl-alanin und Alanyl-leucin zeigt. Eine ähnliche Wirkung haben die Oxysäuren Tyrosin und Isoserin, wenn sie am Ende der Kette stehen. Vielleicht ist das dem elektronegativen Charakter dieser Aminosäuren zuzuschreiben. In ähnlicher Weise könnte die leichte Hydrolyse der beiden Cystinderivate interpretiert werden, obschon man hier auch die längere Kette in Betracht ziehen muß. Bemerkenswert ist die Resistenz der Dipeptide, in denen α-Aminobuttersäure, α-Aminovaleriansäure und Leucin als Acyl fungieren, obschon die beiden letzten Aminosäuren in der Natur so sehr verbreitet sind.

3. Einfluß der Konfiguration.

Sämtliche in der ersten Spalte der Tabelle mit * angeführten Polypeptide sind Racemkörper. Die Hydrolyse findet hier asymmetrisch statt, derart, daß nur die eine Hälfte des Racemkörpers angegriffen wird. Als Produkte der Hydrolyse resultieren stets diejenigen aktiven Aminosäuren, welche in den natürlichen Proteïnstoffen enthalten sind. Einen besonderen Fall bietet hier der Gegensatz zwischen dem spaltbaren Alanyl-leucin A und dem nicht hydrolysierbaren Alanyl-leucin B. In diesen beiden Racemkörpern sind nach früheren Betrachtungen[1]) alle 4 Kombinationen der 4 aktiven Aminosäuren enthalten, d. h. der eine Racemkörper ist *d*-Alanyl-*d*-leucin + *l*-Alanyl-*l*-leucin, und der zweite *d*-Alanyl-*l*-leucin + *l*-Alanyl-*d*-leucin. Unsere Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß von den 4 aktiven Kombinationen nur eine und zwar das *d*-Alanyl-*l*-leucin durch das Ferment angegriffen wird, daß mithin die Verbindung A der zweite Racemkörper ist. Wir zweifeln kaum daran, daß die Untersuchung der aktiven Dipeptide, deren Bereitung schon in Angriff genommen ist, den Schluß bestätigen wird. Diese Überlegung zeigt, daß man die Wirkung des Pankreassaftes für die Ermittlung der Konfiguration mancher Polypeptide benutzen kann.

4. Einfluß der Zahl der Aminosäuren.

Hier ist der Vergleich der verschiedenen Glycinkörper besonders lehrreich. Glycyl-glycin, Diglycyl-glycin und Triglycyl-glycin werden nicht angegriffen, während beim Tetraglycyl-glycin eine unverkennbare Spaltung eintritt. Merkwürdigerweise schließt sich ihm die Biuretbase an, die nach den neuen Untersuchungen von Curtius[2]) der Äthylester des Triglycylglycins ist. Auf die älteren Beobachtungen von Schwarzschild[3]) bezüglich der Spaltung dieser Base durch Trypsin werden wir später zurückkommen. Man ersieht aus diesem Vergleich, daß einerseits die Länge der Glycinkette, andererseits aber auch die Veränderung des Carboxyls von Einfluß auf die Hydrolyse ist. Die Länge der Kette macht sich auch deutlich bemerkbar bei dem Leucyl-glycyl-glycin, das im Gegensatz zum Leucyl-glycin gespalten wird. Daß andererseits Dileucyl-glycyl-glycin nicht hydrolysiert wird, liegt vielleicht an der Konfiguration der Dileucylgruppe.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 2487 [1904]. (*S. 337.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 1284 [1904].
[3]) Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 4, 155 [1903].

5. Einfluß der Beschaffenheit des Fermentes.

Für die älteren Versuche über Hydrolyse der natürlichen Proteïnstoffe und der künstlichen Polypeptide hat man in der Regel das käufliche Trypsin oder Pankreatin benutzt. Diese Präparate werden bekanntlich durch Extraktion der toten und einige Zeit aufbewahrten Pankreasdrüse gewonnen. Sie können deshalb Enzyme enthalten, die dem normalen Pankreassafte fehlen. Als Beweis dafür, daß in der Tat ein Unterschied zwischen der Wirkung des frischen Pankreassaftes und den Pankreasauszügen besteht, können wir einen einfachen und überzeugenden Fall anführen. Das Leucyl-alanin, welches gegen frischen Pankreassaft ganz beständig ist, wird von Pankreatin partiell gespalten, wie der eine von uns in Gemeinschaft mit Bergell früher[1]) beobachtet hat, und wie wir durch eine Wiederholung des Versuches bestätigen konnten. Es liegt deshalb auf der Hand, daß alle maßgebenden Versuche über Wirkung der Pankreasfermente in Zukunft mit dem frischen Safte, der durch die glänzenden Methoden von Pawlow zugänglich geworden ist, angestellt werden müssen. Ob von den verschiedenen Fermenten, die dieser Saft nachweislich enthält, nur eins oder mehrere für die Hydrolyse der Polypeptide oder auch der Proteïnstoffe in Betracht kommen, und ob endlich der Saft von verschiedenen Tieren verschiedene Wirkungen hat, das sind Fragen, mit denen wir uns noch nicht beschäftigt haben. Wir möchten aber auf die Möglichkeit hinweisen, daß gerade durch Benutzung der künstlichen Polypeptide derartige Unterschiede vielleicht am bequemsten und schärfsten nachgewiesen werden können.

Auf Grund der jetzt vorliegenden Beobachtungen kann man die Behauptung aufstellen, daß die Prüfung mit Pankreassaft ein Mittel ist, die große Zahl der künstlichen Polypeptide in biologisch verschiedene Klassen einzuteilen. Dieser Vorteil wird noch mehr hervortreten, sobald es gelingt, eine größere Zahl der optisch-aktiven Polypeptide in gleicher Weise zu untersuchen.

Der uns von Herrn Prof. Pawlow gelieferte Pankreassaft war durch die neue von Pawlow erfundene Fistel entnommen und daher frei von Darmsaft. Er war für den Transport mit einer geringen Menge Thymol versetzt. Bekanntlich ist der frische Pankreassaft hydrolytisch kaum wirksam. Er muß aktiviert werden. Wir haben zu dem Zwecke 5% Darmsaft zugesetzt, der uns ebenfalls von Prof. Pawlow überlassen war. Um dem Einwande zu begegnen, daß durch den Zusatz des Darmsaftes andere hydrolytische Fermente in die Flüssigkeit gelangt seien, die möglicherweise die Hydrolyse der Polypeptide bewirken

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 3103 [1904]. (*S. 591.*)

könnten, so haben wir für einige typische Fälle spontan aktiv gewordenen Pankreassaft benutzt und dabei die gleichen Resultate erhalten. Der verwendete Pankreassaft war eine wasserklare Flüssigkeit und enthielt im Kubikzentimeter 0,03—0,04 g Trockensubstanz, die zum Teil noch aus anorganischen Stoffen bestand und wegen ihrer geringen Menge die Untersuchung der hydrolytischen Produkte kaum erschwerte.

Bei der natürlichen Verdauung unterliegen die Proteïnstoffe zunächst der Wirkung der Magenfermente. Wie weit hier die Hydrolyse geht, ist noch strittig. Während die meisten Beobachter angeben, daß sie im wesentlichen bei der Bildung von Albumosen und Peptonen stehen bleibe, finden sich in der Literatur vereinzelte Angaben, daß auch kleine Mengen von Aminosäuren gebildet werden. Wir haben es deshalb nicht für überflüssig gehalten, die künstlichen Polypeptide der Wirkung von Magensaft zu unterwerfen, der aus einem nach Pawlow dargestellten kleinen Magen gewonnen war. Die bisherigen Untersuchungen erstrecken sich nur auf die folgenden 5 Dipeptide:

Glycyl-*l*-tyrosin Leucyl-alanin Leucyl-leucin,
Dialanyl-cystin Leucyl-glycin

von denen die beiden ersten durch Pankreassaft sehr leicht, und die drei anderen gar nicht angegriffen werden. Das Resultat war in allen Fällen unter den später geschilderten Bedingungen negativ. Wir werden aber diese Versuche auf die komplizierteren Polypeptide ausdehnen in der Hoffnung, daß es so vielleicht gelingt, eine schärfere Grenze zwischen Magen- und Pankreasverdauung aufzufinden, denn die Benutzung der künstlichen Produkte hat den großen Vorteil, daß man mit einheitlichen Substanzen arbeiten kann, während man es beim Abbau der Proteïnstoffe stets mit einem komplizierten, bisher ganz unentwirrbaren Gemisch der verschiedenartigsten Stoffe zu tun hat.

Mit Rücksicht auf die Mühen, die die Darstellung der künstlichen Polypeptide macht, haben wir nur kleine Mengen dieser Stoffe verwenden können. Infolgedessen war es nicht möglich, alle Produkte der Hydrolyse zu isolieren. Wir haben uns vielmehr in der Regel damit begnügt, das charakteristische Spaltprodukt zu gewinnen. Die Einzelheiten der Beobachtung finden sich bei jedem Beispiel erwähnt. Wir halten es aber für zweckmäßig, hier einen kurzen Überblick über die dabei benutzten Methoden zu geben, weil sie in ähnlichen Fällen Verwendung finden können.

Untersuchungsmethoden.

Für die qualitative Erkennung der Hydrolyse ist häufig die polarimetrische Untersuchung das bequemste Mittel. Wir haben deshalb bei allen Polypeptiden, welche Aminosäuren mit asymmetrischen Kohlen-

stoffatomen enthalten, die Lösung nach dem Zusatz von Pankreassaft sofort optisch untersucht, und dann das Drehungsvermögen in Intervallen von ein bis mehreren Tagen von neuem bestimmt. An der eingetretenen Veränderung ließ sich der Verlauf der Hydrolyse verfolgen. Der Versuch wurde erst unterbrochen, wenn das Drehungsvermögen konstant geworden war. War das zu untersuchende Polypeptid ein Racemkörper, so zeigte die ursprüngliche Lösung trotz des Gehalts an Pankreassaft nur eine minimale Drehung und in allen Fällen, in denen diese Inaktivität blieb, konnten wir auch durch die chemischen Methoden keine Hydrolyse nachweisen. Eine Ausnahme bilden natürlich die Polypeptide, die aus Glykocoll zusammengesetzt sind, da hier keine optisch-aktiven Produkte entstehen können.

Für den chemischen Nachweis der Spaltprodukte ist die Isolierung der einzelnen Substanzen unerläßlich. Am häufigsten handelt es sich um die Erkennung von Aminosäuren. Sind dieselben schwerlöslich, wie Tyrosin und Cystin, so kristallisieren sie während des Versuches aus den wässerigen Lösungen aus. In der Regel aber ist eine umständliche Operation für die Abscheidung notwendig. In solchen Fällen haben wir die Flüssigkeit nach Abtrennung des Toluols kurz aufgekocht, um das Ferment zu zerstören, filtriert und unter stark vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Für die Trennung von Aminosäuren und Polypeptiden hat die Estermethode in den meisten Fällen am raschesten zum Ziele geführt. Zu dem Zwecke wurde das Gemisch mit der fünffachen Menge absoluten Alkohols übergossen, und gasförmige Salzsäure unter Kühlung bis zur Sättigung eingeleitet, dann gerade zum Aufkochen erwärmt und rasch wieder stark abgekühlt. War Glykocoll als Spaltprodukt zu erwarten, so wurde die Lösung mit einem winzigen Kriställchen von salzsaurem Glykocollester geimpft, und blieb dann in einer Kältemischung unter häufigem Reiben mehrere Stunden stehen. Der ausgeschiedene salzsaure Glykocollester wurde filtriert, mit eiskaltem Alkohol, später mit Äther gewaschen und nach dem Trocknen im Exsikkator gewogen. Nach einmaligem Umkristallisieren aus heißem Alkohol zeigte dieses Präparat stets den Schmelzpunkt 144° und die Zusammensetzung $C_4H_{10}NO_2Cl$. So ließen sich auch geringe Mengen von Glykocoll isolieren.

Die salzsaure alkoholische Mutterlauge oder bei Abwesenheit von Glykocoll die ursprüngliche Veresterungsflüssigkeit wurde sofort bei sehr geringem Druck (12—15 mm) verdampft, und der Rückstand auf die freien Ester verarbeitet. Es ist dabei am vorteilhaftesten, die Hydrochlorate nicht durch wässerige Alkalien, sondern in methylalkoholischer Lösung mit der berechneten Menge Natriummethylat zu zerlegen, durch vorsichtigen Zusatz von Äther das Kochsalz auszu-

fällen, die methylalkoholische Mutterlauge wieder unter stark vermindertem Druck abzudestillieren und die Dämpfe in verdünnter Salzsäure aufzufangen. Hierbei geht der geringe Rest des Glykocollesters und der gesamte Ester des Alanins, dessen Menge bei solchen Versuchen immer relativ klein ist, völlig in das Destillat über. Beim Abdampfen desselben bleiben die Hydrochlorate der Aminosäuren, von denen das Salz des Alanins in bekannter Weise durch das Drehungsvermögen oder die Umwandlung in die freie Aminosäure identifiziert werden kann.

Der Rückstand, der beim Verdampfen des Methylalkohols bleibt, enthält die Ester von höheren Aminosäuren und Polypeptiden. Laugt man ihn mit Petroläther aus, so gehen die Ester der einfachen Aminosäuren, wie Leucin, Phenylalanin, in Lösung, während die Polypeptidester zurückbleiben. Aus dem Gemisch der Polypeptidester lassen sich nun die Dipeptide recht bequem als Diketopiperazine isolieren. Zu dem Zwecke behandelt man mit alkoholischem Ammoniak und trennt nachher die Diketopiperazine, die nicht mehr basisch und in Wasser ziemlich schwer löslich sind, von den Derivaten der höheren Peptide.

Durch Kontrollversuche haben wir uns überzeugt, daß absichtlich hergestellte Gemische von Aminosäuren, Dipeptiden und Tripeptiden auf diese Weise recht gut getrennt werden können, und daß insbesondere auch bei vorsichtiger Ausführung der Operation keine Hydrolyse der Polypeptide stattfindet.

Selbstverständlich haben wir bei jeder Untersuchungsreihe die Wirksamkeit des Fermentes und die Abwesenheit von Bakterien durch besondere Kontrollversuche festgestellt.

Hydrolysierbare Polypeptide.

Racemisches Alanyl-glycin[1]).

2 g Alanyl-glycin in 15 ccm Wasser gelöst wurden nach Zusatz von 5 ccm Pankreassaft und Toluol 14 Tage bei 36° aufbewahrt. Das Drehungsvermögen der Flüssigkeit war vom 10. Tage an konstant und betrug im 1-Dezimeterrohr 1,5° nach links. Die Lösung wurde jetzt vom Toluol getrennt, kurz aufgekocht, filtriert und im Vakuum bei 40° zur Trockne verdampft, der Rückstand mit 10 ccm absolutem Alkohol übergossen und unter Kühlung gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Zum Schluß wurde kurz aufgekocht. Nach Einimpfen eines Kriställchens von Glykocollesterchlorhydrat und einigem Stehen auf Eis erfolgte bald reichliche Kristallisation, die sich im Verlauf von 12 Stunden noch beträchtlich vermehrte. Die abgesaugte,

[1]) E. Fischer und W. Axhausen, Liebigs Annalen **340**, 128. (*S. 469.*)

über Kalk und Schwefelsäure getrocknete Masse wog 0,5642 g. Sie schmolz nach dem Umlösen aus heißem Alkohol bei 144⁰ (korr.).

0,1977 g Substanz gaben 0,1290 g H_2O und 0,2477 g CO_2.

Berechnet für $C_4H_{10}NO_2Cl$:	Gefunden:
34,43% C u. 7,18% H.	34,17% C u. 7,25% H.

Beim Verdampfen der Mutterlauge vom Glykocollesterchlorhydrat unter geringem Druck verblieb ein fester Rückstand, der aus den Hydrochloraten von Alaninester und Dipeptidester bestand. Wir haben uns mit der Isolierung der Aminosäure begnügt. Zu dem Zwecke wurde der Rückstand in 25 ccm reinem Methylalkohol gelöst, dann in 2 ccm maßanalytisch der Chlorgehalt bestimmt, und nun zu dem Rest der Flüssigkeit die berechnete Menge einer 2-prozentigen methylalkoholischen Lösung von Natrium zugegeben. Um den größten Teil des Kochsalzes zu fällen, fügten wir etwas Äther hinzu, wobei aber darauf zu achten war, daß nicht mit dem Kochsalz auch Dipeptidester gefällt wird. Die filtrierte Flüssigkeit wurde nun unter einem Druck von 15 mm bei gewöhnlicher Temperatur abdestilliert, und die Dämpfe in stark gekühlter verdünnter Salzsäure aufgefangen. Beim Verdampfen dieser salzsauren Lösung blieb ein kristallinischer Rückstand, der wieder in Wasser gelöst und durch Kochen mit Bleioxyd von Chlor befreit wurde. Nach Fällen des gelösten Bleis mit Schwefelwasserstoff gab das Filtrat beim Verdampfen 0,3412 g Alanin, das nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser bei 295⁰ (korr.) unter Zersetzung schmolz.

0,2013 g Substanz gaben 0,1454 g H_2O und 0,2998 g CO_2.

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:	Gefunden:
40,45% C u. 7,87% H.	40,6% C u. 8,02% H.

Bei einem zweiten Versuch mit 1 g Alanyl-glycin, der genau ebenso verlief, wurden 0,1721 g salzsaures Alanin erhalten, dessen optische Bestimmung zeigte, daß *d*-Alanin vorlag. 0,1102 g in 5 ccm Wasser gelöst, drehten im 1-Dezimeterrohr Natriumlicht 0,19⁰ nach rechts. $[\alpha]^D_{20^0} = +8{,}8^0$.

Daß die Drehung etwas zu gering befunden ist, liegt wahrscheinlich an einer kleinen Verunreinigung des Präparates durch Glykocoll, dessen Entfernung als salzsaurer Ester bekanntlich nicht quantitativ ist.

Racemisches Alanyl-alanin[1]).

1 g Alanyl-alanin wurde in 10 ccm Wasser gelöst, mit 3 ccm Pankreassaft und Toluol versetzt und 8 Tage im Brutraum aufbewahrt. Die vom Toluol getrennte, kurz aufgekochte und filtrierte Lösung

[1]) E. Fischer und Karl Kautzsch, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **38**, 2375 [1905]. (*S. 527.*)

drehte im 1-Dezimeterrohr 0,50° nach links. Sie wurde bei 40° im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand fein gepulvert, mit 5 ccm absoluten Alkohols übergossen, durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas unter Kühlung verestert und im Vakuum bei 35° wiederum eingedampft. Die Ester wurden in vorsichtiger Weise mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt, mit Äther aufgenommen, und die ätherische Lösung im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur unter sehr sorgfältiger Kühlung der doppelten Vorlagen abdestilliert. Hierbei ging der Alaninester in das Destillat und ließ sich daraus durch verdünnte Salzsäure ausschütteln. Die salzsaure Lösung hinterließ beim Eindampfen 0,4125 g einer fast farblosen, kristallinischen Masse, die nach der optischen Untersuchung fast reines salzsaures *d*-Alanin war.

0,2123 g in 5 ccm Wasser gelöst drehten Natriumlicht 0,38° nach rechts $[\alpha]^{D}_{20^0} = +9,3^0$.

Aus dem Hydrochlorat wurde das freie Alanin in der üblichen Weise durch Kochen mit gelbem Bleioxyd hergestellt. Es zersetzte sich gegen 296° (korr.).

0,2211 g Substanz gaben 0,3275 g CO_2 und 0,1571 g H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:	Gefunden:
40,45% C u. 7,87% H.	40,4% C u. 7,9% H.

Auf die Isolierung des nicht gespaltenen aktiven Alanyl-alanins, das wir als *l*, *l*-Verbindung betrachten, haben wir wegen der geringen Menge verzichten müssen. Unter der Voraussetzung, daß das racemische Alanyl-alanin zur Hälfte vollständig gespalten war, berechnet sich die Mege des salzsauren *d*-Alanins zu 0,785 g. Die obigen gefundenen 0,4125 g betragen mithin nur 52,5% der Theorie. Wir müssen aber bemerken, daß die Isolierung des Esters aus dem Hydrochlorat durch Alkali und Äther, die wir bei diesem älteren Versuch noch angewandt haben, nicht unerhebliche Verluste mit sich bringt.

Racemisches Alanyl-leucin[1]).

Das angewandte Präparat war ein Gemisch der beiden Isomeren A und B. Da die reine Verbindung B von dem Pankreassaft nicht angegriffen wird, das Gemisch aber unverkennbare Hydrolyse zeigte, so muß die Spaltung bei der Verbindung A eingetreten sein. Eine Wiederholung der Versuche mit der reinen Verbindung A haben wir bisher aus Mangel an Material nicht ausführen können. Deshalb ist auch die Untersuchung der Spaltprodukte unvollständig geblieben.

---

[1]) E. Fischer und Otto Warburg, Liebigs Annalen **340**, 152. (*S. 487.*)

0,5 g wurden in 10 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von Toluol und 4 ccm Pankreassaft 12 Tage im Brutraum aufbewahrt. Die kurz aufgekochte, filtrierte Lösung drehte im 1-Dezimeterrohr 0,4⁰ nach rechts. Die Lösung wurde bei 40⁰ im Vakuum zur Trockne verdampft, und der Rückstand mit 1 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Der unlösliche Teil gab in heißem Wasser gelöst und mit überschüssigem Kupferoxyd gekocht ein blaßblaues Kupfersalz, das ganz das Aussehen und die Eigenschaften des Leucinkupfers zeigte.

Racemisches Leucyl-isoserin A[1]).

1 g Dipeptid wurde in 15 ccm Wasser gelöst und mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft bei 37⁰ aufbewahrt. Nach 7 Tagen drehte die Lösung 0,35⁰ nach links. Nach weiteren 10 Tagen war die Drehung unverändert. Zur Isolierung der Spaltprodukte wurde die vom Toluol getrennte, aufgekochte und filtrierte Lösung unter vermindertem Druck bei einer 40⁰ nicht übersteigenden Temperatur völlig zur Trockne verdampft, und der Rückstand mehrmals mit 50-prozentigem Alkohol ausgekocht. Beim Erkalten des Filtrats schieden sich Kristalle ab, die in der äußeren Form, der geringen Löslichkeit in Wasser und in der Bildung eines blaßblauen, in Wasser äußerst schwer löslichen Kupfersalzes dem Leucin glichen. Der in verdünntem Alkohol unlösliche Teil wurde in Wasser heiß gelöst. Beim Abkühlen trat Kristallisation ein. Das mehrmals aus Wasser umgelöste Produkt schmolz gegen 245⁰ (korr.) und zeigte die Zusammensetzung des Isoserins. Seine Menge betrug 0,2015 g.

0,1909 g Substanz gaben 0,2449 g CO_2 und 0,1186 g H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NO_3$:	Gefunden:
34,26% C u. 6,73% H.	34,9% C u. 6,90% N.

Das Isoserin war optisch-aktiv, die Bestimmung des Drehungsvermögens wurde jedoch nicht ausgeführt.

Glycyl-*l*-tyrosin[2]).

1 g Glycyl-*l*-tyrosin wurde in 20 ccm Wasser gelöst, mit 3 ccm aktiviertem Pankreassaft versetzt und nach Zugabe von Toluol im Brutraum bei 36⁰ aufbewahrt. Nach 8 Stunden zeigte sich bereits eine deutliche Trübung der Lösung und ein leichter Bodensatz, der

---

[1]) E. Fischer und W. F. Koelker, Liebigs Annalen **340**, 172. (*S. 502.*)
[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2495 [1904]. (*S. 346.*)

nach 12 Stunden sich stark vermehrt hatte. Nach 24 Stunden betrug die Menge des bei 100° getrockneten Niederschlages 0,4 g. Das Filtrat gab nach weiterem Stehen im Brutraum eine neue, ziemlich beträchtliche Kristallisation, die nach 2 Tagen 0,25 g wog. Aus der Mutterlauge konnten trotz erneutem Zusatz von Pankreassaft und achttägigem Stehen im Brutraum nur noch 0,04 g desselben Produktes gewonnen werden. Das Rohtyrosin wurde durch Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle gereinigt.

0,1768 g Substanz gaben 0,0973 g H_2O und 0,3874 g CO_2.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_3$:	Gefunden:
59,66% C u. 6,07% H.	59,7% C u. 6,11% H.

Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 0,62 g oder 81,6% der Theorie.

Um das gleichzeitig entstandene Glykocoll nachzuweisen, wurde die vom Tyrosin abfiltrierte Lösung im Vakuum unterhalb 40° zur Trockne verdampft, und der Rückstand mit 3 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Beim Verdampfen des Filtrates blieben 0,28 g zurück. Da dem Glykocoll noch amorphe Produkte beigemengt waren, die die Kristallisation erschwerten, so diente zum endgültigen Nachweis sein Esterchlorhydrat. Es wurde deshalb die Masse gepulvert, mit 3 ccm absolutem Alkohol übergossen, und unter Eiskühlung mit Salzsäuregas gesättigt. Um die Veresterung zu vervollständigen, wurde zum Schluß die leicht getrübte Lösung noch 1—2 Minuten erwärmt und dann sofort wieder abgekühlt. Nach Impfen mit einem Kriställchen von Glykocollesterchlorhydrat schied die in einer Kältemischung stehende Lösung ziemlich rasch einen dicken Kristallbrei ab, der nach dem Absaugen, Waschen und Trocknen über Kalk und Schwefelsäure bei 144° schmolz und alle Eigenschaften des Glykocollesterchlorhydrats besaß. Seine Menge betrug 0,32 = 0,17 g Glykocoll oder 54,8% der Theorie.

Leucyl-*l*-tyrosin[1]).

Zur Verwendung kam das amorphe Präparat, dessen Einheitlichkeit nach der früheren Beschreibung nicht sichergestellt ist. 0,5 g wurden in 30 ccm Wasser gelöst und mit 2 ccm Pankreassaft sowie Toluol bei 36° aufbewahrt. Nach 4 Tagen war eine reichliche Menge (0,25 g) von Kristallen abgeschieden, die nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser 0,15 g ziemlich reines Tyrosin gaben. Die vom Tyrosin möglichst befreite Mutterlauge gab nach dem Verdünnen und Kochen mit

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2498 [1904]. (*S. 348.*)

Kupferoxyd ein in blaßblauen Blättchen kristallisierendes Kupfersalz, das die größte Ähnlichkeit mit dem Leucinkupfer zeigte.

Racemisches Alanyl-glycyl-glycin[1]).

2 g des Tripeptides in 20 ccm Wasser gelöst wurden mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft versetzt und bei 36° aufbewahrt. Nach 9 Tagen betrug die Drehung der Flüssigkeit im 1-Dezimeterrohr 1,0° nach links und blieb dann konstant. Zur Isolierung der Spaltprodukte wurde der Verdampfungsrückstand zunächst mit $2^1/_2$ ccm eiskaltem Wasser zerrieben, rasch abgesaugt und scharf abgepreßt. Es waren 0,3512 g in Lösung gegangen. Die wiederholt in Wasser heiß gelöste und durch vorsichtigen Zusatz von Alkohol gefällte Substanz schmolz gegen 296° (korr.) und besaß die Zusammensetzung des Alanins.

0,1943 g Substanz gaben 0,2875 g CO_2 und 0,1362 g H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:	Gefunden:
40,45% C u. 7,87% H.	40,35% C u. 7,79% H.

Der von eiskaltem Wasser nicht gelöste Teil der Spaltprodukte wurde nach dem Trocknen in der üblichen Weise esterifiziert, und die Ester auf die zuvor beschriebene Weise mit Natriummethylat in Freiheit gesetzt. Beim Abdestillieren der methylalkoholischen Lösung und Verdampfen des Destillates mit Salzsäure konnten noch 0,0815 g salzsaures Alanin gewonnen werden, das nach der optischen Untersuchung *d*-Verbindung war. Um das gleichzeitig entstandene Glycyl-glycin nachzuweisen, wurde das beim Verdampfen des Methylalkohols verbleibende Gemisch der Ester mit alkoholischem Ammoniak versetzt, und die Lösung auf dem Wasserbade verdampft. Als der Rückstand in wenig warmem Wasser gelöst war, schieden sich beim Erkalten die feinen Nadeln des Glycinanhydrids ab.

0,1912 g Substanz gaben 0,2984 g CO_2 und 0,0925 g H_2O.

Berechnet für $C_4H_6N_2O_2$:	Gefunden:
42,10% C u. 5,26% H.	42,5% C u. 5,3% H.

In methodischer Beziehung ist zu bemerken, daß bei Anwesenheit von Glycyl-glycin der Nachweis des Glykocolls als Esterchlorhydrat sehr erschwert ist, weil der salzsaure Ester des Dipeptides ebenfalls in kaltem Alkohol wenig löslich ist. In solchen Fällen ist es ratsam, die Ester mit Natriummethylat in Freiheit zu setzen und die Lösung abzudestillieren. Dabei geht der Glykocollester in das Destillat über und ist nur begleitet von den einfachen Aminosäuren, von denen er sich nun leicht als Esterchlorhydrat trennen läßt.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2987 [1903]. *(S. 330.)*

Racemisches Leucyl-glycyl-glycin[1]).

Eine Lösung von 2 g Tripeptid in 20 ccm Wasser wurde mit 5 ccm Pankreassaft und Toluol versetzt und bei 36° aufbewahrt. Die Flüssigkeit drehte im 1-Dezimeterrohr nach 11 Tagen 0,4° nach links, nach weiteren 7 Tagen betrug die Drehung —0,62° und blieb dann konstant. Die Lösung wurde jetzt nach Entfernung des Toluols kurz mit Tierkohle aufgekocht, filtriert, im Vakuum zur Trockne verdampft, und der Rückstand mit 8 ccm absolutem Alkohol und Salzsäure verestert. Beim längeren Stehen der alkoholischen Lösung bei 0° erfolgte eine ziemlich reichliche Abscheidung von Kristallen, die mit Alkohol und Äther gewaschen und nochmals aus heißem Alkohol umkristallisiert wurden. Ihre Menge betrug 0,615 g. Das Präparat hatte die Eigenschaften des salzsauren Glycyl-glycinesters. Da aber die Analyse keine scharfen Zahlen gab, so wurde er mit alkoholischem Ammoniak übergossen, erwärmt, und die Lösung eingedampft. Hierbei schied sich bald Glycinanhydrid aus, das nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser folgende Zahlen gab:

0,1210 g Substanz gaben 0,1870 g CO_2 und 0,0599 g H_2O.

Berechnet für $C_4H_6N_2O_2$:	Gefunden:
42,10% C u. 5,26% H.	42,15% C u. 5,5% H.

Das Filtrat vom Glycyl-glycinesterchlorhydrat wurde im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und in üblicher Weise mit Alkali und Kaliumcarbonat die Ester in Freiheit gesetzt. Ihre ätherische Lösung wurde in sorgfältig gekühlte Vorlagen bei 12 mm Druck und gewöhnlicher Temperatur abdestilliert. Da das Destillat beim Abdampfen mit Salzsäure nur einen äußerst geringen Rückstand hinterließ, so war kein Ester der niederen Aminosäuren vorhanden. Wäre Glykocoll durch die Hydrolyse entstanden, so hätte man wenigstens eine kleine Menge hiervon finden müssen. Der beim Abdestillieren des Äthers bleibende ölige Rückstand bestand aus Leucinester. Er wurde durch Kochen mit Wasser verseift. Die Menge des erhaltenen Leucins betrug 0,2104 g. Das Präparat zeigte die äußere Form und die Zusammensetzung des Leucins.

0,1856 g Substanz gaben 0,1607 g H_2O und 0,3715 g CO_2.

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$:	Gefunden:
54,9% C u. 9,8% H.	54,6% C u. 9,6% H.

Da es ferner in 20prozentiger Salzsäure die spezifische Drehung $[\alpha]_{20^0}^{D}$ +14,9° hatte, so handelt es sich um das natürliche *l*-Leucin.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2990 [1903]. (*S. 333.*)

Racemisches Glycyl-leucyl-alanin.

Eine Lösung von 2 g Tripeptid in 40 ccm Wasser, die mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft vermischt war, drehte nach 10tägigem Stehen bei 36° im 1-Dezimeterrohr 0,62° nach rechts. Die Drehung änderte sich im Verlauf von 49 Tagen nicht mehr. Nach Abtrennung des Toluols, kurzem Aufkochen und Filtrieren wurde die Lösung im Vakuum bei 40° völlig zur Trockne verdampft, der Rückstand mit $2^1/_2$ ccm eiskaltem Wasser verrieben, rasch abgesaugt und scharf abgepreßt. Das Filtrat hinterließ beim Verdampfen 0,35 g einer festen Masse, die in $2^1/_2$ ccm absolutem Alkohol suspendiert und durch Salzsäuregas esterifiziert wurde. Nach dem Impfen mit einem Kriställchen von Glykocollesterchlorhydrat schied sich beim längeren Stehen in einer Kältemischung eine geringe Menge von Kristallen (0,01 g) ab, die bei 142° schmolzen und somit aller Wahrscheinlichkeit nach Glykocollesterchlorhydrat waren. Die salzsaure alkoholische Mutterlauge vereinigten wir jetzt mit dem Teil der Spaltungsprodukte, der durch die $2^1/_2$ ccm eiskaltes Wasser nicht gelöst war, fügten noch 3 ccm absoluten Alkohol zu und sättigten die Flüssigkeit unter Kühlung mit trockenem Salzsäuregas. Zum Schluß wurde ganz kurze Zeit aufgekocht, und dann unter vermindertem Druck unter 40° zur Trockne verdampft. Im Rückstand haben wir einerseits *d*-Alanin und andererseits Glycyl-leucin nachgegewiesen unter Benutzung derselben Methode, die beim Alanyl-glycylglycin beschrieben wurde. Die Menge des aus dem destilliertem Ester gewonnenen salzsauren Alanins betrug 0,1721 g. Hiervon drehten 0,1102 g in 5 ccm Wasser gelöst im 1-Dezimeterrohr Natriumlicht 0,19° nach rechts, woraus sich $[\alpha]_D^{20°} = +9°$ berechnet.

Der nicht destillierte Teil der Ester wurde in alkoholischem Ammoniak gelöst und damit gekocht. Schon beim Abkühlen fiel Leucylglycinanhydrid aus, das nach dem Umlösen aus heißem Wasser bei 245° schmolz und folgende Zahlen gab:

0,1948 g Substanz gaben 0,4006 g CO_2 und 0,1489 g H_2O.
0,1900 g „ „ 27,4 ccm N (20°, 758 mm).

Berechnet für $C_8H_{14}O_2N_2$:	Gefunden:
56,47% C, 8,24% H u. 16,47% N.	56,08% C, 8,5% H u. 16,45% N.

Das Präparat zeigte keine optische Aktivität, obschon es aller Wahrscheinlichkeit nach aus einem optisch-aktiven Dipeptid entstanden war.

Alanyl-leucyl-glycin[1]).

Wir haben zwei Versuche ausgeführt, jedesmal mit 2 g Tripeptid, das in 20 ccm Wasser gelöst, mit Toluol und 5 ccm Pankreassaft ver-

[1]) E. Fischer u. A. Brunner, Liebigs Annalen **340**, 142. (*S. 484.*)

setzt und 8 bzw. 10 Tage im Brutraum aufbewahrt wurde. Die vom Toluol getrennte, kurz aufgekochte und filtrierte Lösung drehte im 1-Dezimeterrohr das eine Mal 2,2°, das andere Mal 2,1° nach rechts. Sie wurde im Vakuum unterhalb 40° zur Trocknen verdampft. Für die Untersuchung des Rückstandes haben wir dann zwei verschiedene Methoden benutzt, die beide verdienen, ausführlich beschrieben zu werden.

a) Der Rückstand wurde mit 4 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Das wässerige Filtrat hinterließ beim Eindampfen 0,79 g, die jetzt nur mit 1 ccm eiskaltem Wasser verrieben wurden, wobei 0,5 g in Lösung gingen. Der beim Verdampfen des Filtrates verbleibende Rückstand enthielt das durch die Hydrolyse entstandene *d*-Alanin. Für seine völlige Reinigung haben wir es nach der mehrfach beschriebenen Methode in den Ester verwandelt, wobei gleichzeitg, aber vergebens, auf Glykocollester geprüft wurde. Aus dem Hydrochlorat wurden die Ester mit Alkali und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt, durch Äther extrahiert, der Äther abdestilliert, und das Destillat mit verdünnter Salzsäure durchgeschüttelt und zur Trockene verdampft. Der Rückstand war salzsaures *d*-Alanin und wog 0,2669 g oder 55% der Theorie, wenn man annimmt, daß nur die eine Hälfte des racemischen Tripeptides völlig gespalten wird.

0,2014 g in 5 ccm Wasser gelöst, drehten im Dezimeterrohr Natriumlicht 0,37° nach rechts, mithin $[\alpha]_{20^0}^{D} = +9,5^0$.

Aus dem salzsauren Salz wurde in der üblichen Weise durch Kochen mit Bleioxyd das freie Alanin bereitet. Es zeigte bei raschem Erhitzen den Schmelz- und Zersetzungspunkt 296° (korr.) und die Zusammensetzung des Alanins:

0,1317 g Substanz gaben 0,1959 g CO_2 und 0,0953 g H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:	Gefunden:
40,45% C u. 7,87% H.	40,56% C u. 8,04% H.

Die durch Auslaugen mit 4 ccm eiskaltem Wasser von *d*-Alanin befreite Masse enthielt das Dipeptid und noch andere stark aktive Substanzen, wahrscheinlich das aktive Tripeptid. Als die ganze Menge nämlich in 30 ccm Wasser gelöst war, drehte diese Flüssigkeit im 1-Dezimeterrohr 1,2° nach rechts. Wir haben uns damit begnügt, aus dem Gemenge das Leucyl-glycin zu isolieren. Zu dem Zwecke wurde das trockene Gemisch bei gewöhnlicher Temperatur mit 4 ccm Wasser sorgfältig ausgelaugt, wobei der größere Teil in Lösung ging. Der Rückstand enthielt das gesuchte Dipeptid. Er wurde in wenig heißem Wasser gelöst, die Flüssigkeit durch Aufkochen mit Tierkohle entfärbt und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wog 0,1613 g und zeigte ungefähr die spezifische Drehung —3,7°. Er wurde nochmals in wenig heißem Wasser gelöst und die Flüssigkeit im Exsikkator eingeengt.

Dabei schied sich die Substanz als farbloses, kristallinisches Pulver ab. Nach der Analyse ist das Produkt ein Leucyl-glycin:

0,1406 g Substanz gaben 0,2616 g CO_2 u. 0,1077 g H_2O.

Berechnet für $C_8H_{16}O_3N_2$:	Gefunden:
51,06% C u. 8,51% H.	50,74% C u. 8,51% H.

Allerdings ist es fraglich, ob wir das Präparat bei der geringen Menge und der unvollkommenen Art der Isolierung ganz rein gehabt haben. Das ist der Grund, warum keine genauere Bestimmung des Drehungsvermögens ausgeführt wurde. Im Kapillarrohr rasch erhitzt, begann es gegen 228° zu sintern, färbte sich dann braungelb und schmolz unter starkem Aufschäumen bis gegen 238° (korr. 246°). Die geschmolzene Masse erstarrte beim Erkalten zu mikroskopisch feinen Nädelchen, die wahrscheinlich das Anhydrid des Dipeptides sind.

b) Der Rückstand wurde direkt mit 8 ccm absolutem Alkohol übergossen, unter Eiskühlung Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet und zum Schluß kurz aufgekocht. Da die klare Lösung auch beim längeren Stehen in einer Kältemischung und nach erfolgter Impfung kein Glykocollesterchlorhydrat abschied, so wurde sie unter geringem Druck unterhalb 35° zur Trockene verdampft, und der Rückstand in 50 ccm Methylalkohol gelöst. Nachdem in 5 ccm dieser Flüssigkeit der Chlorgehalt titrimetrisch ermittelt war, fügten wir zum Rest der Lösung die berechnete Menge einer 2-prozentigen methylalkoholischen Lösung von Natrium und versetzten dann noch zur Fällung des Kochsalzes mit einer mäßigen Menge Äther. Die jetzt filtrierte Flüssigkeit wurde unter geringem Druck abdestilliert. Das Destillat gab beim Verdampfen mit verdünnter Salzsäure 0,2511 g salzsaures *d*-Alanin.

0,2005 g in 5 ccm Wasser gelöst, drehten im 1-Dezimeterrohr Natriumlicht 0,35° nach rechts. $[\alpha]_{20^0}^{D} = +9,08^0$.

Der beim Abdestillieren des Methylalkohols bleibende Rückstand enthielt die Ester des Leucyl-glycins und des nicht gespaltenen Tripeptids. Er wurde in alkoholischem Ammoniak gelöst und die Flüssigkeit zum Sieden erhitzt. Hierbei verwandelte sich der Leucyl-glycinester in Leucyl-glycinanhydrid, das in Alkohol schwerlöslich ist, und deshalb beim Abkühlen als voluminöse kristallinische Masse ausfiel. Es wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus kochendem Alkohol unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Es bildete dann mikroskopisch feine, meist kugelförmig vereinigte Nädelchen, die den richtigen Schmelzpunkt 246° (korr.) des Leucyl-glycinanhydrids zeigten. Seine Menge betrug 0,2523 g.

0,1213 g Substanz gaben 0,2493 g CO_2 und 0,0901 g H_2O.

Berechnet für $C_8H_{14}O_2N_2$:	Gefunden:
56,47% C u. 8,24% H.	56,05% C u. 8,25% H.

Das Präparat war optisch-inaktiv im Gegensatz zu dem aktiven Dipeptid, das im vorigen Versuche beschrieben ist. Die vom Leucylglycinanhydrid abfiltrierte alkoholische Mutterlauge gab beim Eindampfen eine weitere Kristallisation des Anhydrids, und schließlich hinterblieb ein Gemisch, aus dem es uns nicht gelang, das aktive, nicht hydrolysierbare Tripeptid zu isolieren.

Dialanyl-cystin[1]).

Eine Lösung von 1 g in 15 ccm Wasser, die mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft versetzt war, zeigte nach 12-stündigem Stehen bei 36° bereits einen deutlichen Bodensatz, und nach 4 Tagen betrug die Menge des kristallisierten Niederschlages 0,35 g. Das Filtrat gab nach weiteren 5 Tagen im Brutraum noch 0,1 g, und aus der etwa auf die Hälfte eingeengten Mutterlauge fielen beim Abkühlen noch 0,18 g aus. Der Niederschlag bestand zum größten Teil aus Cystin. Zur Reinigung wurde er in wenig warmem 10-prozentigen Ammoniak gelöst und die erkaltete Flüssigkeit durch Essigsäure gefällt. Die Menge des so erhaltenen Cystins betrug 0,5 g oder 79% der Theorie. Die Reinheit wurde durch eine Schwefelbestimmung festgestellt.

0,2012 g Substanz gaben 0,3915 g $BaSO_4$ = 0,0538 g S.

Berechnet für $C_6H_{12}N_2S_2O_4$:	Gefunden:
26,66% S.	26,74% S.

Dileucyl-cystin[1]).

Leider stand uns nur eine sehr geringe Menge Material zur Verfügung. Immerhin dürfte der Versuch in der Hauptsache entscheidend sein. 0,2 g amorphes Dileucyl-cystin in 10 ccm Wasser gelöst und mit Toluol und 1 ccm Pankreassaft versetzt, gab bei siebentägigem Stehen bei 36° 0,1 g kristallinischen Niederschlag. Dieser wurde in der üblichen Weise gereinigt und so 0,06 g eines Präparats erhalten, das die charakteristische Kristallform und auch die sonstigen Eigenschaften des Cystins zeigte.

Tetraglycyl-glycin[2]).

Das Pentapeptid ist in kaltem Wasser so schwer löslich, daß wir für den Versuch eine nur 1-prozentige Lösung anwenden mußten. 100 ccm davon blieben mit 4 ccm Pankreassaft und mit Toluol im

[1]) E. Fischer u. U. Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 4579. (*S. 399.*)
[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 2507 [1904]. (*S. 358.*)

Brutraum bei 36° stehen. Nach 3 Wochen war die Biuretreaktion zwar noch nicht vollständig verschwunden, aber doch sehr viel schwächer geworden als die der Kontrollprobe oder einer frischen 1-prozentigen Lösung des Pentapeptids. Die Flüssigkeit wurde nun zum Nachweis des Glykocolls genau in derselben Weise behandelt wie bei Alanyl-leucyl-glycin unter a. Die Menge der in 2 ccm eiskaltem Wasser löslichen Substanz betrug 0,3122 g, und daraus wurden 0,3014 g Glykocollester-chlorhydrat vom Schmelzpunkt 144° gewonnen.

0,1976 g Substanz gaben 0,2500 g CO_2 und 0,1290 g H_2O.

Berechnet für $C_4H_{10}NO_2Cl$:	Gefunden:
34,43% C u. 7,18% H.	34,50% C u. 7,25% H.

Die übrigen Produkte der Hydrolyse sind noch nicht genügend untersucht.

Triglycyl-glycin-äthylester (Biuretbase von Curtius).

Das Verhalten der Base gegen Trypsin ist bereits von M. Schwarzschild[1]) untersucht worden. Er fand, daß bei der Einwirkung des Fermentes die Biuretreaktion verschwand, und daß dann in der Flüssigkeit Glykocoll enthalten war. Er glaubte ferner die Base als den Äthylester des Hexaglycyl-glycins betrachten zu dürfen. In einer kurzen Kritik der Versuche und Schlußfolgerungen von Schwarzschild hat der eine von uns in Gemeinschaft mit Bergell[2]) darauf aufmerksam gemacht, daß die Struktur der Base auch durch die Versuche von Schwarzschild keineswegs festgestellt sei, und daß durch den Nachweis des Glykocolls die Hydrolyse der Base nicht bewiesen werde, da diese nach den älteren Versuchen von Curtius und Goebel selbst leicht in Glykocoll verwandelt werden könne. Inzwischen hat Th. Curtius[3]) gezeigt, daß die reine Biuretbase der Äthylester des Triglycyl-glycins ist, und daß das von Schwarzschild benutzte Präparat sehr stark mit Glycinanhydrid verunreinigt war. Unter diesen Umständen schien eine Wiederholung des hydrolytischen Versuches unter Anwendung von Pankreassaft wünschenswert.

1 g Base, die nach der neuen Vorschrift von Curtius hergestellt war, wurde in 30 ccm Wasser gelöst, mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft versetzt und im Brutraum aufbewahrt. Nach 14 Tagen war die Biuretreaktion noch deutlich vorhanden. Im Laufe der dritten Woche wurde sie aber schon recht schwach und nach vier Wochen war sie

[1]) A. a. O.
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2607 [1903]. (*S. 587.*)
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 1284 [1904].

eben noch wahrnehmbar, während eine Kontrollprobe der Base ohne Ferment bei gleicher Behandlung nach sechs Wochen noch sehr starke Biuretreaktion zeigte. Wenn Schwarzschild bei seinen Versuchen die Biuretreaktion schon am 5. oder 6. Tage verschwinden sah, so liegt dies vielleicht an der größeren Menge oder auch an der verschiedenen Beschaffenheit seines Fermentes, das aus Rinderpankreas nach 5- bis 6-tägiger Autodigestion gewonnen und mittels der Uranylacetatmethode gereinigt war, aber vielleicht trotzdem neben den pankreatischen auch autolytische Fermente enthielt.

Zum Nachweis des Glykocolls wurde die biuretfreie Flüssigkeit vom Toluol getrennt, kurz aufgekocht, filtriert, dann unter stark vermindertem Druck unterhalb 40° zur Trockene verdampft und der Rückstand mit 2 ccm eiskaltem Wasser sorgfältig ausgelaugt. Beim Verdunsten hinterließ diese Lösung 0,354 g Rückstand. Er wurde gepulvert, mit 3 ccm absolutem Alkohol versetzt und durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas anfangs unter Kühlung bis zur Sättigung verestert. Da ein geringer Rückstand blieb, so wurde die alkoholische Lösung filtriert. Beim längeren Stehen des Filtrates in einer Kältemischung nach Impfung mit einem winzigen Kriställchen von Glykocollesterchlorhydrat begann eine reichliche Abscheidung von Kristallen, die nach 12 Stunden abfiltriert und mit kaltem Alkohol gewaschen 0,2045 g betrugen und nach dem Schmelzpunkt 142° und den sonstigen Eigenschaften salzsaures Glykocollesterchlorhydrat waren.

Unsere Resultate bestätigen also die Beobachtungen von Schwarzschild über die Zerstörung der Biuretbase durch das Pankreasferment und geben außerdem den sicheren Beweis, daß dabei Glykocoll entsteht. Allerdings ist seine Menge so gering, daß als Hauptprodukt andere Substanzen entstehen müssen. In der Tat bleibt beim Auslaugen des Glykocolls mit eiskaltem Wasser ein erheblicher Rückstand, der uns aus den abiureten Polypeptiden des Glykocolls zu bestehen scheint, den wir aber noch nicht genügend untersucht haben.

Nicht hydrolysierbare Polypeptide.

Racemisches Glycyl-alanin[1]).

Angewandt 1 g Dipeptid, 10 ccm Wasser, 3 ccm Pankreassaft. Nach 18tägigem Stehen im Brutraum war die Lösung optisch gänzlich inaktiv und aus der in der üblichen Weise von Toluol befreiten, aufgekochten und filtrierten Flüssigkeit wurden 0,87 g unverändertes Dipeptid vom Schmelzpunkt 227° (korr.) wiedergewonnen.

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 2489 [1904]. (*S. 340.*)

0,1911 g Substanz gaben 0,2910 g CO_2 und 0,1200 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_{10}N_2O_3$:	Gefunden:
41,53% C u. 6,9% H.	41,53% C u. 6,98% H.

Ein zweiter Versuch unter denselben Bedingungen verlief ebenso. Hier wurde die recht scharfe Probe auf Glykocoll bzw. sein Esterchlorhydrat angestellt, blieb aber negativ.

Glycyl-glycin.

Seine Widerstandsfähigkeit gegen das gewöhnliche käufliche Trypsin ist schon früher[1]) beobachtet worden. In Übereinstimmung damit steht das Verhalten gegen Pankreassaft. Eine Lösung von 1 g in 25 ccm Wasser wurde mit 3 ccm Pankreassaft und Toluol versetzt. Nach 14tägigem Stehen bei 36⁰ war keine wägbare Menge von Glykocoll nachweisbar.

Racemisches Alanyl-leucin B[2]).

Eine Lösung von 1 g Dipeptid in 10 ccm Wasser mit 3 ccm Pankreassaft unter Zusatz von Toluol war nach vierwöchentlichem Stehen im Brutraum optisch-inaktiv. Trotzdem wurde sie nach Entfernung des Toluols kurz aufgekocht, filtriert und verdampft, der Rückstand mit 2 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt und der hierbei in Lösung gegangene Teil auf die flüchtigen Ester der einfachen Aminosäuren verarbeitet. Das Resultat war gänzlich negativ. Ein zweiter Versuch verlief genau ebenso.

Racemisches Leucyl-alanin[2]).

Wegen der geringen Löslichkeit wurden 1 g Dipeptid in 60 ccm Wasser gelöst und mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft im Brutraum aufbewahrt. Nach 6 Wochen war die Flüssigkeit noch optisch inaktiv, und es konnte daraus 0,8105 g unverändertes Dipeptid zurückgewonnen werden. Zweimalige Wiederholung des Versuches führte zu demselben Resultate.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, übt das käufliche Pankreatin auf das Dipeptid deutlich hydrolisierbare Wirkung aus, wie folgender Versuch zeigt.

Eine Lösung von 1 g Dipeptid in 55 ccm Wasser wurde mit 0,2 g Pankreatin (von der Firma Rhenania in Aachen) geschüttelt, filtriert und die Flüssigkeit nach Zusatz von Toluol im Brutraum aufbewahrt.

---

[1]) E. Fischer u. P. Bergell, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2598. (*S. 577.*)

[2]) E. Fischer u. Otto Warburg, Liebigs Annalen **340**, 152. (*S. 492.*)

Beim Beginn des Versuches drehte die Lösung im 1-Dezimeterrohr 0,23° nach links. Nach 12 Tagen war die Drehung auf 0,10° zurückgegangen. Die Flüssigkeit wurde dann nach Abtrennung des Toluols kurz aufgekocht, filtriert und bei geringem Druck unterhalb 40° zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit 2 ccm eiskaltem Wasser sorgfältig ausgelaugt, und der ungelöste Teil auf die gewöhnliche Art in das Kupfersalz verwandelt. Aus der eingeengten Lösung schieden sich 0,0812 g eines blaßblauen Kupfersalzes ab, das nach dem äußeren Aussehen, der Löslichkeit und der Analyse sicherlich der Hauptmenge nach Leucinkupfer war.

0,0804 g Substanz gaben 0,0210 g CuO = 0,0167 g Cu.

Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:	Gefunden
19,6% Cu.	20,7% Cu.

Die Menge des Salzes war verhältnismäßig gering. Wir haben bereits darauf aufmerksam gemacht, daß die Hydrolyse wohl durch den Gehalt des Pankreatins an anderen, dem Pankreassaft fremden Enzymen bewirkt werde.

Racemisches Leucyl-glycin[1]).

1 g Dipeptid in 35 ccm Wasser gelöst, mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft versetzt und 14 Tage im Brutraum aufbewahrt. Die Flüssigkeit zeigte keine optische Aktivität. Durch Eindampfen wurde das unveränderte Dipeptid wieder gewonnen, und in der letzten Mutterlauge konnte durch die Estermethode kein Glykocoll nachgewiesen werden. Bei einem zweiten Versuch unter denselben Bedingungen und einem dritten, der ebenso ausgeführt war, aber 3 Wochen dauerte, war das Resultat dasselbe. Bei dem vierten Versuch wurden 4 g Dipeptid in 125 ccm Wasser gelöst, mit Toluol und 14 ccm Pankreassaft versetzt und im Brutraum aufgehoben. Nach 30 Tagen war die Lösung noch optisch inaktiv. Nach weiteren 18 Tagen hatte sie allerdings ein ganz geringes Drehungsvermögen erhalten, d. h. im 1-Dezimeterrohr 0,05° nach links. Der allergrößte Teil des Dipeptides wurde auch hier unverändert zurückgewonnen. Als aber der am leichtesten lösliche Teil des Verdampfungsrückstandes mit der Estermethode auf Glykocoll geprüft wurde, gelang es, 0,11 g Glykocollesterchlorhydrat zu isolieren. Hier war also eine ganz geringe Hydrolyse eingetreten. Wir müssen es aber unentschieden lassen, ob sie durch das Pankreasferment herbeigeführt wurde, denn bei so lang andauernder Wirkung und der Temperatur von 36° kann vielleicht auch schon Wasser allein eine schwache hydrolytische Wirkung ausüben.

---

[1]) E. Fischer u. A. Brunner, Liebigs Annalen **340**, 142 [1905]. (*S. 479.*)

Racemisches Leucyl-leucin[1]).

Wegen der geringen Löslichkeit mußten hier auf 1 g Dipeptid 100 ccm Wasser verwendet werden. Diese Lösung blieb mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft versetzt 4 Wochen bei 36° stehen. Die Flüssigkeit war auch zum Schluß optisch inaktiv, und durch Verdampfen konnte das Dipeptid fast quantitativ zurückerhalten werden.

0,1201 g Substanz gaben 0,2617 g CO_2 und 0,1061 g H_2O.

Berechnet für $C_{12}H_{24}N_2O_3$:	Gefunden:
59,02% C u. 9,84% H.	59,4% C u. 9,8% H.

Zweimalige Wiederholung des Versuches unter denselben Bedingungen gab dasselbe Resultat.

Da Leucin in den natürlichen Proteïnstoffen fast ausnahmslos und häufig in erheblicher Menge vorkommt, so durfte man erwarten, daß seine Polypeptide durch das Pankreasferment besonders leicht angegriffen würden. Wir vermuten deshalb, daß im vorliegenden Falle die Konfiguration des Moleküls das hindernde Moment ist. Wahrscheinlich ist nur die Kombination *l*-Leucyl-*l*-leucin für das Ferment angreifbar, und diese kann in dem vorliegenden Racemkörper fehlen. Leider ist das zweite von der Theorie vorgesehene racemische Leucyl-leucin noch unbekannt.

Racemisches Aminobutyryl-glycin[2]).

Eine Lösung von 1 g Dipeptid in 10 ccm Wasser blieb nach Zusatz von 4 ccm Pankreassaft und Toluol 14 Tage im Brutraum. Sie war dann noch inaktiv, und in der Flüssigkeit konnte nach dem Verdampfen im Vakuum durch die scharfe Estermethode kein Glykocoll nachgewiesen werden.

Racemische Aminobutyryl-aminobuttersäure A[2]).

1 g Dipeptid, 25 ccm Wasser und 3 ccm Pankreassaft mit Toluol bei 37° aufbewahrt. Nach 4 Wochen war die Lösung noch optischinaktiv, und es konnten daraus 0,85 g unverändertes Dipeptid zurückgewonnen werden. Das isolierte Produkt bräunte sich gegen 265° (korr.) und schmolz gegen 272° (korr.).

Racemische Aminobutyryl-aminobuttersäure B[3]).

Der Versuch wurde unter genau denselben Bedingungen wie der vorhergehende ausgeführt. Das Resultat war ebenso negativ. Die Menge des zurückgewonnenen reinen Dipeptids betrug 0,875 g. Es

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2491. (*S. 299, 342.*)
[2]) E. Fischer und Karl Raske, Liebigs Annalen **340**, 180. (*S. 513.*)
[3]) E. Fischer und Karl Raske, Liebigs Annalen **340**, 180 [1905].

bräunte sich beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen 246° (korr.) und schmolz gegen 256° (korr.).

Racemisches Aminoisovaleryl-glycin[1]).

Eine Lösung von 1 g in 35 ccm Wasser mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft blieb 14 Tage im Brutraum stehen. Sie war dann optisch inaktiv, und in der Flüssigkeit konnte durch die Estermethode kein Glykocoll gefunden werden.

Glycyl-phenylalanin[2]).

Angewandt 1 g Dipeptid, 20 ccm Wasser, 3 ccm Pankreassaft und Toluol. Nach vierwöchigem Stehen bei 36° zeigte die Lösung keine Drehung des polarisierten Lichtes. Sie wurde dann im Vakuum zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit 2 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Diese Lösung hinterließ beim Verdampfen 0,1902 g Rückstand, aus dem kein Glykocollesterchlorhydrat gewonnen werden konnte. Es war also keine nachweisbare Hydrolyse eingetreten.

Racemisches Leucyl-prolin[3]).

Eine Lösung von 1 g in 10 ccm Wasser blieb nach Zusatz von Toluol und 3 ccm Pankreassaft bei 36° stehen. Nach 3 Wochen zeigte die Flüssigkeit keine Drehung des polarisierten Lichtes, und eine Probe blieb nach dem Kochen mit Kupferoxyd völlig farblos. Damit ist unzweideutig bewiesen, daß keine Hydrolyse des Dipeptides stattgefunden hatte, denn die Spaltungsprodukte, die dabei entstehen müßten, Leucin und Prolin, geben beide stark blau gefärbte Kupfersalze. Die ursprüngliche Flüssigkeit wurde dann nochmals mit 3 ccm Pankreassaft versetzt und wiederum 3 Wochen im Brutraum aufbewahrt. Auch jetzt blieb die Kupferprobe negativ, und man kann deshalb sagen, daß das Dipeptid von dem Pankreassaft gar nicht angegriffen wird. Ob das an der eigentümlichen Struktur der Verbindung liegt, die wahrscheinlich auch das abweichende Verhalten gegen Kupferoxyd bedingt, oder ob ihr stereochemischer Aufbau dem Ferment nicht paßt, müssen wir vorderhand unentschieden lassen, denn das zweite von der Theorie vorgesehene stereoisomere Leucylprolin ist

---

[1]) Die Verbindung wurde im hiesigen Institute von Herrn Schenkel nach der allgemeinen Methode aus α-Bromisovaleriansäure und Glykocoll dargestellt und wird später beschrieben werden.

[2]) H. Leuchs u. U. Suzuki, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3313. (*S. 392.*)

[3]) E. Fischer und Emil Abderhalden, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 3074 [1904]. (*S. 382.*)

noch unbekannt, und man kann a priori über sein Verhalten gegen Pankreasferment nichts sagen.

Diglycyl-glycin[1]).

Eine Lösung von 1 g in 35 ccm Wasser mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft war 14 Tage im Brutraum aufbewahrt worden. Auch hier war Glykocoll durch die Estermethode nicht nachweisbar.

Triglycyl-glycin[2]).

Die Versuche mit diesem Tetrapeptid wurden besonders sorgfältig ausgeführt, weil es einerseits die der Biuretbase entsprechende freie Säure ist und andererseits auch wie jene die Biuretreaktion gibt. Wegen der geringen Löslichkeit konnte nur eine $2^1/_2$-prozentige Lösung verwendet werden. Wir haben drei Versuche ausgeführt mit einer Lösung von je 1 g Triglycyl-glycin in 40 ccm Wasser, die mit Toluol und 3 ccm Pankreassaft versetzt war und bei 36° aufbewahrt wurde. Bei der ersten Probe wurde die Flüssigkeit nach 10 Tagen untersucht. Die beiden anderen blieben je 4 Wochen im Brutraum stehen. Nach dieser Zeit war die Biuretreaktion der Flüssigkeit nicht merklich vermindert, und es gelang auch nicht, nach dem oben angegebenen Verfahren in der Flüssigkeit Glykocoll nachzuweisen, denn es entstand bei der Veresterung nur eine äußerst geringe Menge einer Abscheidung, die nicht einmal eine Schmelzpunktbestimmung gestattete. Jedenfalls war der allergrößte Teil des Tetrapeptids unverändert.

Dileucyl-glycyl-glycin[3]).

Wegen der geringen Löslichkeit mußten auf 1 g 75 ccm Wasser genommen werden. Die Lösung blieb mit Toluol und 4 ccm Pankreassaft einen Monat im Brutraum. Sie war dann noch optisch völlig inaktiv, und aus der Flüssigkeit konnten 0,8125 g reines Tetrapeptid wiedergewonnen werden.

0,0994 g Substanz gaben 0,1950 g CO_2 und 0,0758 g H_2O.

Berechnet für $C_{16}H_{30}N_4O_5$:	Gefunden:
53,63% C u. 8,38% H.	53,5% C u. 8,4% H.

Glykocoll war in der Mutterlauge durch die Estermethode nicht nachzuweisen. Bei zweimaliger Wiederholung des Versuches unter den gleichen Bedingungen wurde niemals optische Aktivierung der Lösung beobachtet.

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2983 [1903] und **37**, 257 [1904]. (*S. 327, 350.*)

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2501 [1904]. (*S. 352.*)

[3]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **37**, 2506 [1904]. (*S. 356.*)

Versuche mit Magensaft.

Wie bereits erwähnt, stammte der Saft aus einem kleinen Magen vom Hunde und war uns ebenfalls von Herrn Prof. Pawlow überlassen worden. Er war sehr wirksam. 1 g Caseïn wurde in 10 ccm des Saftes bei Bruttemperatur im Laufe von etwa 2 Stunden völlig gelöst, unter Bildung von Albumosen und Peptonen.

Glycyl-*l*-tyrosin.

1 g Dipeptid wurde in 10 ccm Magensaft gelöst und bei 36° aufbewahrt. Nach 14 Tagen wurde die klare Lösung im Vakuum bei einer 35° nicht übersteigenden Temperatur zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit 2 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt. Es ging alles in Lösung. Nun wurde nochmals zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit 3 ccm absolutem Alkohol übergossen und trockenes Salzsäuregas zunächst unter Kühlung und schließlich unter kurzer Erwärmung eingeleitet. Auch nach Impfen mit einem Kriställchen von Glykocollesterchlorhydrat und nach längerem Stehen auf Eis erfolgte keine kristallinische Abscheidung. Glykocoll war also auch nicht in nachweisbarer Menge vorhanden.

Der Versuch wurde noch zweimal mit demselben Erfolge wiederholt.

Dialanyl-cystin.

1 g Dialanyl-cystin wurde in 10 ccm Magensaft gelöst und im Brutraum aufbewahrt. Nach 8 Tagen wurde die Lösung unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur zur Trockene verdampft, der Rückstand mit 3 ccm Alkohol übergossen und trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet, dann die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, die Ester mit Alkali und Kaliumkarbonat in der üblichen Weise in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Der Äther wurde bei gewöhnlicher Temperatur unter vermindertem Druck destilliert und das Destillat in einer sorgfältig gekühlten, verdünnte Salzsäure enthaltenden Vorlage aufgefangen. Beim Verdampfen der Salzsäure verblieb fast kein Rückstand. Alanin war somit nicht entstanden.

Leucyl-leucin, Leucyl-alanin und Leucyl-glycin.

Je 0,5 g in 10 ccm Magensaft gelöst blieb 14 Tage im Brutraum. In allen drei Fällen konnte das unveränderte Dipeptid wiedergewonnen werden. Beim Leucyl-glycin schlug auch der Versuch, in der gewohnten Weise Glykocoll als Esterchlorhydrat nachzuweisen, fehl.

Man könnte gegen die Versuche mit Magensaft den Einwand erheben, daß die Menge der Salzsäure, die nur 0,4% des Saftes betrug, für die Bindung des Dipeptides und noch mehr für die Bindung der Spaltprodukte unzureichend war. Andererseits aber ist zu beachten, daß die Reaktion der Lösung dauernd ziemlich stark sauer war, und man hätte darum erwarten müssen, daß wenigstens eine teilweise Hydrolyse der Produkte stattfinden würde. Immerhin werden wir später die Versuche unter Zusatz von wechselnden Mengen Salzsäure wiederholen und auch andere peptische Fermente, wie Papayotin, in den Kreis der Untersuchung ziehen.

---

42. Emil Fischer: Über die Hydrolyse der Proteïnstoffe.

Vortrag, gehalten auf der Naturforscherversammlung zu Karlsbad 1902. Autoreferat aus der Chemiker-Zeitung, 1902, Jg. 26. Nr. 80, S. 939.

Zuerst faßte er die Resultate kurz zusammen, die man bisher bei der totalen Hydrolyse der Proteïnstoffe gewonnen hat, und hob den Vorteil hervor, den die sogen. Estermethode für die Isolierung und Unterscheidung der Aminosäuren gewährt. Im einzelnen betonte er die weite Verbreitung des Phenylalanins und Alanins, welche der des Glykocolls und Tyrosins mindestens gleichkommt, ferner der Aminovaleriansäure und besonders auch der Säuren mit zyklischer Stickstoffbindung, Pyrrolidinkarbonsäure, ihres Oxyderivates und des neuerdings von Hopkins isolierten Tryptophans. Er wies sodann auf die Möglichkeit hin, daß Leucin, Alanin und Aminovaleriansäure durch relativ einfache Vorgänge aus den Hexosen und Pentosen entstehen, und besprach im Anschluß daran die Bedeutung der Oxyaminosäuren für die Proteïn-Chemie. Das öftere Vorkommen des früher nur im Seidenleim gefundenen Serins ist von ihm und seinen Mitarbeitern bereits nachgewiesen, eine zweite Oxyaminosäure, die Oxypyrrolidinkarbonsäure hat sich dazu gesellt, und manche Beobachtungen deuten darauf hin, daß noch andere ähnliche Stoffe in den Proteïnkörpern enthalten sind. Diese Oxyaminosäuren bilden gewissermaßen die Brücke zwischen den gewöhnlichen Aminosäuren und den Zuckern und verdienen deshalb bei Betrachtungen über die biologische Verwandlung von Kohlenhydraten und Proteïnstoffen ineinander besondere Berücksichtigung. Zum Schlusse behandelt der Redner die Verkupplung der Aminosäuren in der Proteïnmolekel. Der Gedanke, daß dabei säureamidartige Gruppen die Hauptrolle spielen, liegt am nächsten, wie es ja auch Hofmeister bei seinem allgemeiner gehaltenen Vortrage am Vormittage angenommen habe. Die gleiche Überzeugung habe ihn schon vor $1^1/_2$ Jahren veranlaßt, die synthetische Verkettung von Aminosäuren zu versuchen. Die Frucht dieser Studien war die Auffindung des Glycyl-glycins $NH_2.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$, des Alanyl-alanins, Leucyl-leucins, des Carbäthoxyglycyl-glycyl-leucins usw. Um nun den Beweis zu liefern, daß

ähnliche Gruppen in der Proteïnmolekel vorhanden sind, hat er in Gemeinschaft mit Dr. Bergell die Hydrolyse des Seidenfibroins von neuem untersucht. Das Fibroin löst sich, wie schon bekannt, leicht in kalter starker Salzsäure, und durch Alkohol wird dann ein Produkt gefällt, welches Weyl Sericoin genannt hat. Läßt man aber die Lösung in der 3-fachen Menge Salzsäure von 1,19 spez. Gew. 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, so entsteht beim Versetzen mit viel absolutem Alkohol nur wenig Niederschlag mehr, und der größte Teil ist jetzt in der Lösung als das Hydrochlorat eines peptonartigen Körpers. Beim Verdampfen unter stark vermindertem Drucke und bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur bleibt das Salz als amorphe Masse zurück. Wird es in wässeriger Lösung mit Silberkarbonat behandelt und das Filtrat nach genauer Ausfällung des gelösten Silbers durch Salzsäure verdunstet, so resultiert ein farbloses amorphes Präparat, welches alkalisch reagiert, bitter schmeckt, sehr stark die Biuret- und Tyrosinfärbung gibt, in Wasser sehr leicht löslich ist und in seinem ganzen Charakter den Peptonen ähnelt. Besonders interessant ist sein Verhalten gegen Trypsin. Wird seine wässerige Lösung mit etwas Ammoniak und dem frischen Ferment versetzt, so beginnt schon nach mehreren Stunden die Kristallisation von nahezu reinem Tyrosin, und nach 2 Tagen ist dessen Abspaltung vollständig. Durch Verdunsten der Lösung gewinnt man jetzt ein neues peptonartiges Produkt, das sich von dem ersten vorzugsweise durch die Abwesenheit von Tyrosin unterscheidet. Derartige beschränkte Wirkungen der Fermente werden zweifellos bei dem weiteren Studium der Proteïngruppe eine große Rolle spielen. Dieses zweite Pepton läßt sich aus wässeriger Lösung mit Alkohol und Äther fällen und bildet nach dem Waschen mit Methylalkohol ein weißes, nicht hygroskopisches Pulver, welches 40,6% C, 6,6% H und 18,4% N enthielt, in wässeriger Lösung stark nach links drehte und bei totaler Spaltung mit Salzsäure 40,1% Glykocoll und 28,5% Alanin gab. Beim 1—2-stündigen Erwärmen mit 10-prozentigem Barytwasser auf 90° entwickelt es Ammoniak, verliert die optische Aktivität fast vollständig, und es entstehen nun neue Produkte, von denen eines in die Klasse des Glycyl-glycins gehört. Die vom Baryt befreite Lösung hinterläßt nämlich beim Verdunsten einen Sirup, der beim längeren Stehen im Exsikkator teilweise krystallisiert. Die vom Sirup abgepreßte Masse, deren weitere Reinigung durch Umlösen auf Schwierigkeiten stieß, wurde durch Behandlung mit β-Naphtalinsulfochlorid und Alkali in das Naphtalinsulfonderivat übergeführt, welches in kaltem Wasser schwer löslich ist und gut kristallisiert. Nach der Analyse (gef. C 54,2, H 4,5, N 8,1) und dem Resultat der totalen Hydrolyse, wobei Glykocoll und Alanin entstehen,

ist das Präparat wahrscheinlich ein β-Naphtalinsulfon-glycyl-alanin; jedenfalls gehört das Produkt, aus dem es entstanden ist, in die Reihe des Glycyl-glycins und analoger Verbindungen. Diese Beobachtung ist, wie leicht ersichtlich, von allgemeiner Bedeutung, weil sie die Möglichkeit beweist, kristallisierbare Produkte zu gewinnen, die zwischen den Peptonen und Aminosäuren stehen. Der Redner macht deshalb den Vorschlag, in Anlehnung an die bekannte Unterscheidung der Kohlenhydrate als Disaccharide, Trisaccharide usw. die Körper vom Typus des Glycyl-glycins Dipeptide zu nennen und anhydridartige Kombinationen einer größeren Anzahl von Aminosäuren als Tripeptide usw. zu bezeichnen.

---

43. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroïns.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **39**, 752 (1906).
(Eingegangen am 12. Februar.)

Auf der Naturforscher-Versammlung zu Karlsbad im September 1902 hat der eine von uns (Fischer) einen Vortrag über die Hydrolyse der Proteïnstoffe gehalten, der nur im Auszug in der Chemiker-Zeitung vom 4. Oktober 1902, Nr. 80, Jg. 26, nach einem Autoreferat wiedergegeben ist. Er machte darin die Mitteilung, daß es ihm in Gemeinschaft mit Dr. Bergell gelungen sei, durch kombinierte Hydrolyse des Seidenfibroïns mit starker kalter Salzsäure, Trypsin und warmem Barytwasser ein kristallinisches Produkt zu gewinnen, das zur völligen Reinigung in das β-Naphtalinsulfoderivat verwandelt wurde. Nach der Analyse und dem Resultat der totalen Hydrolyse glaubte er dieses Präparat als die Naphtalinsulfoverbindung eines Dipeptids und zwar wahrscheinlich des Glycyl-alanins betrachten zu dürfen. Ein späterer Versuch, denselben Körper durch Synthese zu gewinnen, schlug fehl, denn die beiden synthetischen β-Naphtalinsulfoderivate des Glycyl-*d*-alanins und des *d*-Alanyl-glycins zeigten zwar im allgemeinen ganz ähnliche Eigenschaften, unterschieden sich aber durch den Schmelzpunkt[1]). Dazu gesellte sich eine neue Schwierigkeit. Die glücklichen Bedingungen, welche bei dem ersten publizierten Versuch die Gewinnung des analysenreinen Körpers ermöglicht hatten, konnten später nicht mehr genau getroffen werden, und es zeigte sich, daß die β-Naphtalinsulfopräparate bei zahlreichen späteren Hydrolysen stets durch Verbindungen der einfachen Aminosäuren oder der höheren Peptide verunreinigt waren. Da außerdem Dr. Bergell durch äußere Verhältnisse verhindert wurde, weiter an dieser Untersuchung teilzunehmen, so blieb sie längere Zeit liegen. Wir haben sie aber vor einigen Monaten wieder aufgenommen, nachdem es uns bei einer

---

[1]) Emil Fischer und Peter Bergell: Über die Derivate einiger Dipeptide und ihr Verhalten gegen Pankreasfermente. Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2592 [1903]. (*S. 572.*)

anderen Arbeit[1]) gelungen war, eine neue Methode für die Abscheidung der Dipeptide aus Gemischen mit Aminosäuren und höheren Peptiden zu finden. Diese beruht auf dem verschiedenen Verhalten der Ester. Sie sind bei den einfachen Aminosäuren leicht flüchtig und deshalb bequem zu entfernen. Ferner haben die Ester der Dipeptide die Eigentümlichkeit, rasch in die gut kristallisierenden Diketopiperazine überzugehen, welche verhältnismäßig leicht von den Estern der höheren Peptide getrennt werden können.

Auf diese Weise ist es uns nun gelungen, aus den hydrolytischen Spaltprodukten des Seidenfibroïns in reichlicher Menge ein Methyldiketopiperazin, $NH\left\langle\begin{matrix} CH_2-CO \\ CO-CH.CH_3 \end{matrix}\right\rangle NH$, zu gewinnen, das identisch ist mit einem synthetischen Produkt aus Glykocoll und *d*-Alanin.

Dieses Diketopiperazin entspricht zwei Dipeptiden, dem Glycyl-*d*-alanin und dem *d*-Alanyl-glycin. Wir glauben aber, daß aus dem Seidenfibroïn das Glycyl-*d*-alanin in überwiegender Menge oder vielleicht ausschließlich gebildet wird, denn bei einigen Versuchen wurde das Gemisch der Spaltungsprodukte der längeren Wirkung des Pankreassaftes unterworfen, der nach unserer früheren Beobachtung das *d*-Alanyl-glycin leicht spaltet, und hier war die Menge des später isolierten Anhydrids nicht wesentlich kleiner als dort, wo die Hydrolyse mit Säuren allein durchgeführt wurde.

Um unseren Befund sicher zu stellen, war es natürlich notwendig, die sekundäre synthetische Bildung des obigen Diketopiperazins aus Glykocoll und *d*-Alanin bei dem Isolierungsverfahren auszuschließen. Durch die später beschriebenen Kontrollversuche glauben wir dies genügend getan zu haben.

Das Glycyl-*d*-alanin bietet den ersten Fall, wo die Synthese der Polypeptide zusammentrifft mit dem hydrolytischen Abbau der Proteïne, und wir können die Versicherung abgeben, daß es uns ohne die synthetischen Erfahrungen nicht gelungen wäre, seine Bildung bei dem analytischen Prozeß zu erkennen. Wir werden selbstverständlich dieselbe Methode anwenden, um andere Dipeptide als Spaltprodukte der Proteïne aufzusuchen und haben die feste Hoffnung, daß die weitere Ausnutzung der synthetischen Resultate auch dazu führen wird, kompliziertere Peptide in dem bisher unentwirrbaren Gemisch, welches man Peptone und Albumosen nennt, zu entdecken.

Da das Seidenfibroïn in Wasser unlöslich ist und deshalb von den Verdauungsfermenten nicht angegriffen wird, so muß die Hydro-

[1]) Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft. Zeitschr. für physiol. Chem. **46**, 52 [1905]. (*S. 595.*)

lyse zunächst mit starken Säuren bewerkstelligt werden. Vermeidet man höhere Temperatur, so ist die Menge der gebildeten Aminosäuren gering, und das Hauptprodukt besteht aus peptonartigen Körpern. Ob man dabei rauchende Salzsäure oder 70-prozentige Schwefelsäure anwendet, scheint für den Verlauf der Hydrolyse keinen wesentlichen Unterschied zu machen. Wir haben die Schwefelsäure in dem Falle bevorzugt, wo hinterher eine Verdauung durch Pankreassaft stattfinden sollte, weil sie sich bequemer als die Salzsäure entfernen läßt. Eine wesentliche Änderung in dem Resultate hat sich übrigens bei der nachträglichen Behandlung mit Pankreassaft gegenüber der Wirkung in Säure allein nicht ergeben.

Experimenteller Teil.

Hydrolyse mit Schwefelsäure und Pankreassaft.

250 g Seidenfibroïn wurden mit 1500 ccm 70-prozentiger Schwefelsäure übergossen. Beim öfteren Umschütteln war nach einigen Stunden klare Lösung eingetreten. Die bräunlich gefärbte Flüssigkeit wurde dann 5 Tage bei 18° aufbewahrt und nun mit etwa der fünffachen Menge kaltem Wasser unter Abkühlung vermischt; dabei scheidet sich in verhältnismäßig kleiner Menge ein Produkt ab, dessen Eigenschaften an Weyl's Sericoïn[1]) erinnern. Ohne dies zu filtrieren, fällten wir jetzt die Schwefelsäure durch einen mäßigen Überschuß von Barythydrat, trennten dann den dicken Niederschlag von der Flüssigkeit durch Zentrifugieren und laugten das Baryumsulfat noch mehrmals mit warmem Wasser aus. Aus dem Filtrat fällten wir den Baryt genau mit Schwefelsäure und verdampften die abermals filtrierte Flüssigkeit unter geringem Druck bis auf etwa 1 L. Die braungelb gefärbte Flüssigkeit gab eine tiefrote Biuretprobe und bei der Sättigung mit Ammoniumsulfat einen flockigen Niederschlag. Die Gesamtlösung wurde mit 10 ccm aktivem Pankreassaft versetzt und nach Zugabe von Toluol 8 Tage im Brutraum aufbewahrt. Schon am ersten Tage machte sich die Abscheidung von Tyrosin bemerkbar[2]).

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1407 [1888].

[2]) Daß das Tyrosin bei der Wirkung des Pankreasfermentes sehr rasch erscheint, haben wir früher schon beim Caseïn angegeben, wo die Abscheidung bei Bruttemperatur bereits nach mehreren Stunden beginnt und nach 1—2 Tagen beendet ist (vgl. Zeitschr. für physiol. Chemie **39**, 81 [1903]). Dieselbe Erscheinung wurde nochmals von Emil Abderhalden und Béla Reinbold betont (ebenda **44**, 284 [1905] und **46**, 159 [1905]). Wir können deshalb dem in jüngster Zeit von den Herren Adrian John Brown und Edmund Theodore Millar (Proceed. of the Chem. Society **21**, Nr. 301 [1905]) aufgestellten Satz, daß man allgemein das Tyrosin als spätes Produkt der tryptischen Hydrolyse betrachtet habe, nicht beistimmen.

Als schließlich die Verdauungsflüssigkeit auf Zimmertemperatur abgekühlt war, betrug seine Menge 10 g, mithin 40% der Quantität, die bei der totalen Hydrolyse des Seidenfibroïns erhalten wird. Zum Teil liegt das daran, daß eine erhebliche Menge von Tyrosin in der Flüssigkeit wahrscheinlich durch die anderen Spaltungsprodukte zurückgehalten wird, denn beim starken Eindampfen unter vermindertem Druck konnten noch 5 g gewonnen werden. Vielleicht sind aber auch tyrosinhaltige Polypeptide vorhanden, die von dem Pankreasferment nicht vollständig gespalten werden. Beim völligen Verdampfen der Flüssigkeit unter geringem Druck blieb ein braungelber Sirup, der sich in kaltem Wasser zum allergrößten Teil wieder löste. Der geringe, dabei bleibende Rückstand (1,2 g) war wieder Tyrosin, aber ziemlich unrein.

Die wässerige Lösung wurde nun in zwei Hälften geteilt. Wie die Untersuchung einer Probe zeigte, enthielt jede derselben 70 g Trockensubstanz. Von dem Seidenfibroïn bis hierher war also schon ein erheblicher Verlust eingetreten, der teils durch den beim Verdünnen der schwefelsauren Lösung entstandenen Niederschlag, teils durch ungenügendes Auswaschen des Baryumsulfats und endlich durch Entfernung des Tyrosins verursacht war.

Die eine Hälfte der wässerigen Lösung, entsprechend 70 g Rückstand, wurde unter geringem Druck zum Sirup verdampft, dann mit 500 ccm absolutem Alkohol übergossen und trockene, gasförmige Salzsäure langsam bis zur Sättigung eingeleitet, so daß die Temperatur 50⁰ nicht überschritt. Nach 14-stündigem Stehen wurde die alkoholische Lösung bei 12 mm Druck aus einem Bade, dessen Temperatur nicht über 35⁰ stieg, verdampft und die Veresterung genau in der gleichen Weise wiederholt. Dann wurde die Lösung unter denselben Vorsichtsmaßregeln zum Sirup verdampft, der Rückstand in absolutem Alkohol gelöst und diese Lösung genau auf 250 ccm verdünnt. Nachdem in einer Probe dieser Flüssigkeit der Gehalt an Salzsäure titrimetrisch festgestellt war, wurde sie mit der für das Chlor genau berechneten Menge einer $2^1/_2$-prozentigen Lösung von Natrium in Alkohol versetzt, das Chlornatrium abfiltriert und die bräunlich gefärbte Mutterlauge bei 10 mm Druck aus einem Bade verdampft, dessen Temperatur zum Schluß auf 65⁰ stieg. Das alkoholische Destillat enthielt kleine Mengen von Aminosäureestern. Es wurde deshalb mit wässeriger Salzsäure angesäuert und zur Trockene verdampft. Der Rückstand betrug nur 3 g. Aus ihm konnten 1,5 g Glykocollesterchlorhydrat gewonnen werden. Der übrige Teil war wohl größtenteils Alanin.

Der beim Abdestillieren des Alkohols und der Aminosäureester zurückgebliebene bräunlich-grüne Sirup mußte die Ester der Poly-

peptide und der komplizierten Aminosäuren enthalten. Er löste sich zum größten Teil in warmem, absolutem Alkohol. Das Ungelöste bestand fast nur aus Kochsalz. In die klare, alkoholische Lösung wurde nun unter Vermeidung von Erwärmung trockenes Ammoniakgas bis zur Sättigung eingeleitet, um die Dipeptidester in Diketopiperazine zu verwandeln. Nach 6-stündigem Stehen begann in der dunkel gefärbten, aber klaren Lösung die Bildung eines kristallinischen Niederschlages, der nach weiterem 24-stündigen Stehen abfiltriert, scharf abgepreßt und mit kaltem Alkohol gewaschen wurde. Er gab noch schwach die Biuretprobe und auch Millon's Reaktion, färbte sich aber beim Kochen in wässeriger Lösung mit Kupferoxyd nur sehr wenig, enthielt also offenbar nur noch kleine Mengen von Aminosäuren oder Polypeptiden. Durch Auskochen mit nicht zuviel trocknem Aceton konnte er von den Substanzen befreit werden, welche die Biuret- und Millon's Probe verursachten. Zur weiteren Reinigung wurde das Produkt zweimal aus heißem Alkohol unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Es bildete dann feine Nädelchen, welche nach dem Trocknen bei 100° folgende für die Formel $C_5H_8N_2O_2$ gut stimmende Werte gab.

0,1959 g Sbst.: 0,3367 g CO_2, 0,1123 g H_2O. — 0,1270 g Sbst.: 24,2 ccm N (19°, 766 mm).

$C_5H_8N_2O_2$. Ber. C 46,88, H 6,25, N 21,88.
Gef. „ 46,87, „ 6,37, „ 22,1.

Die Verbindung hat nicht allein die gleiche Zusammensetzung, sondern besitzt auch manche äußere Ähnlichkeit mit dem früher beschriebenen inaktiven Glycyl-alaninanhydrid[1]). So fängt sie, im Kapillarrohr erhitzt, gegen 235° an braun zu werden und schmilzt zwischen 240° und 242° (korr.) unter geringer Zersetzung und teilweiser Sublimation. Sie löst sich leicht in Wasser und auch ziemlich leicht in heißem Alkohol und besitzt einen schwach bitteren Geschmack. Von dem eben erwähnten synthetischen Produkte unterscheidet sie sich durch die optische Aktivität.

Eine Lösung, welche in 4,8609 g Wasser 0,2999 g Sbst. enthielt, drehte im Dezimeterrohr Natriumlicht 0,24° nach links.

$$[\alpha]_{D_4}^{20} = -3,9^0.$$

Daß die Verbindung ein Derivat des Glycyl-*d*-alanins ist, beweist auch das Resultat der Hydrolyse, für welche 1 g mit 5 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 im geschlossenen Rohr 6 Stunden auf 100° erhitzt wurde. Zur Trennung der beiden Aminosäuren diente wieder

---

[1]) Emil Fischer und Erich Otto, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **36**, 2113 [1903]. (*S. 321.*)

die Estermethode. Die Menge des Glykocollesterchlorhydrats betrug 0,8 g, entsprechend 0,43 g Glykocoll.

0,2057 g Sbst.: 0,2570 g CO_2, 0,1356 g H_2O.

$C_4H_{10}NO_2Cl$. Ber. C 34,41, H 7,17.

Gef. „ 34,07, „ 7,32.

Aus der Mutterlauge wurde das Alanin gewonnen und gab folgende Zahlen:

0,2010 g Sbst.: 0,2966 g CO_2, 0,1416 g H_2O.

$C_3H_7NO_2$. Ber. C 40,45, H 7,87.

Gef. „ 40,24, „ 7,83.

Die spezifische Drehung des salzsauren Salzes wurde $+7,8^0$ gefunden. Es handelt sich also um *d*-Alanin, nur war es nicht ganz rein, sondern enthielt etwa 25% Racemkörper.

Endlich haben wir noch obiges Anhydrid durch Schütteln mit der für 1,2 Moleküle berechneten Menge *n*-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur in das Dipeptid zurückverwandelt und hierbei ein Präparat erhalten, welches folgende Zahlen gab:

0,1925 g Sbst.: 0,2914 g CO_2, 0,1203 g H_2O.

$C_5H_{10}O_3N_2$. Ber. C 41,09, H 6,85.

Gef. „ 41,28, „ 6,94.

Wir sind aber der Ansicht, daß es ein Gemisch von zwei Isomeren, die aus dem Anhydrid entstehen können, d. h. von Glycyl-*d*-alanin und von *d*-Alanyl-glycin, war.

Endlich konnten wir noch unser Anhydrid vergleichen mit synthetisch gewonnenem Glycyl-*d*-alaninanhydrid[1]). Beim Vermischen beider Präparate zeigte sich keine Veränderung des Schmelzpunktes, auch im Aussehen der Kriställchen und der Löslichkeit war die größte Ähnlichkeit vorhanden. Eine kleine Differenz zeigte sich nur im Drehungsvermögen, welches bei unserem Präparate etwas geringer war. Das würde sich leicht erklären durch die Beimengung von etwas Racemkörper, der bei der brutalen Aufspaltung des Seidenfibroïns durch die starke Säure wohl entstehen kann.

Wir zweifeln also nicht daran, daß unser Produkt Glycyl-*d*-alaninanhydrid ist. Die Ausbeute an ganz reinem Präparat betrug 5,2 g für die Hälfte der wässerigen Lösung, die 70 g Trockenrückstand enthielt. In Wirklichkeit ist die Menge des Anhydrids sicher erheblich größer, denn die Trennung von den anderen Produkten der Hydrolyse und die völlige Reinigung ist mit starken Verlusten verbunden.

---

[1]) Diese Verbindung hat Herr A. Schulze unter meiner Leitung nach bekannter Methode hergestellt. Die Beschreibung der Synthese wird später erfolgen.
E. Fischer.

In der Tat wird die Ausbeute besser, wenn man aus der wässerigen Lösung erst die komplizierteren Substanzen durch Phosphorwolframsäure entfernt. Wir haben für den Zweck einen anderen Teil derselben wässerigen Lösung, die für den obigen Versuch gedient hatte, soweit verdünnt, daß sie nur 1% Trockenrückstand enthielt, und mit einer 5-prozentigen Lösung von Phosphorwolframsäure so lange versetzt, als noch ein Niederschlag entstand. Das Filtrat wurde dann in der üblichen Weise durch Baryt gefällt, der Überschuß des letzteren mit Schwefelsäure genau entfernt, das Filtrat unter geringem Druck zum Sirup verdampft und dieser genau so, wie zuvor beschrieben, nach der Estermethode behandelt. Auf 10 g Trockenrückstand der wässerigen Lösung konnten so 1,2 g reines Glycyl-*d*-alaninanhydrid isoliert werden.

Hydrolyse mit Salzsäure.

30 g Seidenfibroïn wurden anfangs unter öfterem Umschütteln mit 90 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 übergossen und zuerst 3 Tage bei 18° und schließlich 4 Tage bei 37° aufbewahrt. Die klare Flüssigkeit war dunkel mit einem Stich ins Violette gefärbt. Sie wurde mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt, und die Hauptmenge der Salzsäure durch Eintragen von überschüssigem, fein gepulvertem Kupferoxydul entfernt. Nachdem das gelöste Kupfer durch Schwefelwasserstoff gefällt war, wurde die Flüssigkeit unter geringem Druck zum Sirup verdampft, und dieser nach der Estermethode in der zuvor beschriebenen Weise auf Glycyl-*d*-alaninanhydrid verarbeitet. Dieses zeigte dieselben Eigenschaften, wie bei dem vorigen Versuche.

0,1308 g Sbst.: 0,2244 g CO_2, 0,0749 g H_2O.

$C_5H_8N_2O_2$. Ber. C 46,88, H 6,25.

Gef. „ 46,79, „ 6,36.

Die Ausbeute an reinem Präparat betrug hier 4,2 g oder 12% des angewandten Fibroïns. Der Versuch beweist also, daß die Bildung dieses Produktes unabhängig von der Wirkung des Pankreassaftes ist.

Kontrollversuche.

Um dem Einwande zu begegnen, daß bei der Abscheidung des Glycyl-*d*-alaninanhydrids eine Synthese aus zuvor gebildetem Glykocoll und *d*-Alanin stattfinden könne, haben wir folgende Versuche angestellt.

1. Je 5 g Glykocoll und Alanin wurden mit Äthylalkohol und Salzsäure verestert, die Lösung unter vermindertem Druck verdampft, der Rückstand wieder in Alkohol gelöst, die Ester mit der

berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit gesetzt, und die filtrierte, alkoholische Lösung bei 10—15 mm Druck abdestilliert, bis die Temperatur des Bades 65⁰ betrug. Es blieb ein geringer, schmieriger Rückstand, der nur zum kleinen Teil in kochendem Alkohol löslich war. Aus dieser alkoholischen Lösung schied sich nach dem Einleiten von gasförmigem Ammoniak nichts aus. Beim vollständigen Verdampfen betrug der Rückstand 0,4 g, aus dem wir vergeblich versucht haben, Glycyl-alaninanhydrid abzuscheiden,

2. 20 g fein gepulvertes Glykocoll und 23 g inaktives Alanin wurden genau so, wie bei der obigen ersten Hydrolyse des Seidenfibroïns in der fünffachen Menge 70-prozentiger Schwefelsäure gelöst und 5 Tage bei 18^0 aufbewahrt. Nachdem dann die Flüssigkeit mit Wasser verdünnt und die Schwefelsäure genau mit Baryt entfernt war, wurde das Filtrat unter vermindertem Druck auf 150 ccm eingeengt und mit 5 ccm aktivem Pankreassaft unter Zusatz von Toluol 8 Tage im Brutraum aufbewahrt. Die weitere Verarbeitung der Flüssigkeit geschah dann genau so, wie bei dem obigen Versuche mit Seidenfibroïn. Bei der Destillation ging der allergrößte Teil des angewandten Glykocolls und Alanins über und als Rückstand blieben nur 4 g zurück, von denen nur 1,2 g in kochendem, absolutem Alkohol löslich waren. Aus dieser alkoholischen Lösung gelang es uns durch Einleiten von Ammoniak nicht, Glycylalaninanhydrid abzuscheiden. Es entstand wohl ein ganz geringer Niederschlag, der aber Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe löste.

3. Um die weitere Möglichkeit auszuschließen, daß die übrigen Spaltprodukte der Proteïne etwa durch katalytische Wirkung ein Zusammentreten von Glykocoll und Alanin zum Dipeptid veranlassen könnten, haben wir das glykocollfreie Caseïn unter Zusatz von Glykocoll und *d*-Alanin der Hydrolyse durch kalte rauchende Salzsäure unterworfen.

50 g Caseïn (Hammarsten), 10 g Glykocoll und 10 g *d*-Alanin wurden mit 210 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 bei 18^0 übergossen und umgeschüttelt, bis Lösung eingetreten war. Diese Flüssigkeit blieb noch 3 Tage bei 18^0 stehen, wurde dann bei 10—15 mm Druck eingedampft und nun, wie bei den obigen Versuchen mit Seidenfibroïn, auf die Ester verarbeitet. Die beim Abdestillieren der alkoholischen Lösung übergehenden Ester wurden in der üblichen Weise durch Zusatz von Salzsäure und Verdampfen der Flüssigkeit in die Hydrochlorate der Aminosäuren übergeführt. Die Menge der trockenen Hydrochlorate betrug 24 g, während aus der Quantität der angewandten Aminosäuren 28,7 g sich berechnen. Der nicht flüchtige Teil der Ester wurde dann in alkoholischer Lösung mit Ammoniak

behandelt. Auch hier ist es uns nicht gelungen, die Abscheidung eines kristallinischen Produktes zu beobachten, und wir halten uns deshalb zu der Behauptung berechtigt, daß auch hier irgendwie erhebliche Mengen von Glycyl-*d*-alaninanhydrid nicht vorhanden sein konnten.

4. Endlich haben wir noch geprüft, ob bei der Hydrolyse des Seidenfibroïns mit 70-prozentiger Schwefelsäure und nachfolgender Behandlung mit Pankreassaft erhebliche Mengen von Monoaminosäuren gebildet werden, was schon nach den Resultaten der Veresterung sehr unwahrscheinlich war.

Zu dem Zwecke haben wir die Lösung der hydrolytischen Spaltprodukte in der oben schon angegebenen Weise mit Phosphorwolframsäure von den höheren Polypeptiden befreit und nach Entfernung der Phosphorwolframsäure in der üblichen Weise mit *β*-Naphtalinsulfochlorid und Alkali behandelt. Die hierbei entstehenden, in Wasser unlöslichen *β*-Naphtalinsulfoderivate bildeten eine zähe, amorphe Masse, von der beim Auskochen mit Äther nur ein kleiner Teil gelöst wurde. Da die Naphtalinsulfoderivate des Glykocolls und des Alanins in Äther leicht löslich sind, so können diese Monoaminosäuren nur in ganz kleiner Menge unter den Spaltprodukten des Seidenfibroïns nach der Behandlung mit kalter Schwefelsäure und Pankreassaft vorhanden gewesen sein.

Alle diese Beobachtungen sprechen auf das Bestimmteste gegen die Möglichkeit einer sekundären Bildung des Glycyl-*d*-alaninanhydrids aus primär entstandenem Glykocoll und *d*-Alanin.

Das Glycyl-*d*-alaninanhydrid ist übrigens nicht das einzige Diketopiperazin, welches sich aus der alkoholischen Lösung der aus dem Seidenfibroïn durch Säurespaltung entstehenden Polypeptide bei der Behandlung mit Ammoniak abscheidet. Es ist uns vielmehr gelungen, aus der letzten Kristallisation einen anderen Körper zu isolieren, der in Wasser schwer löslich ist und die Zusammensetzung eines Glycyltyrosinanhydrids besitzt und bei der Aufspaltung mit Salzsäure Glykocoll und Tyrosin lieferte. Da wir aber den Körper bisher nur in kleiner Menge unter Händen hatten, so wollen wir seine ausführliche Besprechung verschieben, bis seine Konstitution durch die Synthese ganz sichergestellt ist.

---

44. Emil Fischer: Über die Hydrolyse des Caseïns durch Salzsäure.

Zeitschrift für physiologische Chemie 33, 151 (1901).
(Eingegangen am 5. Juli.)

Unter den Spaltungsprodukten, welche das Caseïn mit Salzsäure liefert, hat man bisher mit Sicherheit festgestellt: Tyrosin und Leucin, Asparagin- und Glutaminsäure, Arginin und Lysin. Endlich wurde von Cohn[1]) noch eine Verbindung $C_{12}H_{22}N_2O_2$ beobachtet, welche mit dem Leucinimid isomer ist und aller Wahrscheinlichkeit nach sekundär aus einer Aminosäure gebildet wird.

Daß die erwähnten Produkte aber keineswegs die einzigen Bestandteile des Caseïns sind, zeigen alle Angaben über ihre Mengen, die um so kleiner werden, je mehr sich die Beobachter bemüht haben, reine Präparate darzustellen. Die letzten Angaben dieser Art rühren von Cohn[2]) her, welcher eine sogenannte quantitative Spaltung des Caseïns beschrieben hat. Mehr als die Hälfte seiner Produkte sind undefinierbare Sirupe, und auch die kristallisierten Partien, wie das rohe Leucin, tragen alle Kennzeichen von Gemischen. Es war deshalb von vornherein zu erwarten, daß eine vollkommenere Untersuchung der Hydrolyse noch eine Reihe von bisher übersehenen Stoffen zutage fördern werde.

Aber Angesichts der vielen Mühe und Sorgfalt, welche bei den älteren Arbeiten auf diesen Gegenstand verwandt wurde, konnte man sich der Überzeugung nicht verschließen, daß mit den bisher gebrauchten Methoden neue Resultate nur sehr schwer zu erzielen seien.

Wie ich vor kurzem mitgeteilt habe[3]), ist es mir nun gelungen, für die Scheidung und Reinigung von Aminosäuren ein neues Verfahren aufzufinden, welches auf der fraktionierten Destillation ihrer Ester beruht. Die Aminosäuren werden dabei zunächst nach der Angabe von Curtius[4]) mit Salzsäure und Alkohol verestert, dann folgt die Abscheidung aus den Hydrochloraten nach meiner Beobachtung

---

[1]) Zeitschrift für physiol. Chem. **22**, 170 [1897]; **29**, 283 [1900].
[2]) Zeitschrift für physiol. Chem. **26**, 395 [1899].
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 433 [1901]. (*S. 173.*)
[4]) Journ. f. prakt. Chemie **37**, 159 [1888].

durch konzentriertes Alkali bei niederer Temperatur und schließlich die Destillation der Ester unter sehr geringem Druck.

Ich habe mich zunächst darauf beschränkt, das Verfahren für die Monoaminsäuren auszubilden, und will nun beim Caseïn die großen Vorteile desselben zeigen. Es ist dadurch gelungen, unter seinen Spaltungsprodukten folgende bisher übersehene Stoffe

Aminovaleriansäure,
Phenylalanin,
α-Pyrrolidincarbonsäure

mit Sicherheit nachzuweisen und die Anwesenheit von Glykocoll sowie von anderen nicht näher charakterisierten Aminosäuren wahrscheinlich zu machen[1]).

Das meiste Interesse darunter verdient die α-Pyrrolidincarbonsäure, welche bisher nur als synthetisches racemisches Produkt bekannt war[2]), aber aus dem Caseïn auch als optisch-aktive Form erhalten werden konnte. Ob dieselbe ebenso wie die anderen Aminosäuren als primäres Spaltungsprodukt zu betrachten ist, soll später diskutiert werden.

Als Material für die Untersuchung, welche mit größeren Mengen durchgeführt werden mußte, diente die beste Sorte des käuflichen Caseïns (puriss. Merck). Wie weit die Resultate auch für das nach der Vorschrift von Hammarsten dargestellte Präparat oder für das Pflanzencaseïn gelten, bleibt noch festzustellen.

Zersetzung des Caseïns durch Salzsäure.

Die Hydrolyse, welche Hlasiwetz und Habermann[3]) durch langes Kochen mit verdünnter Säure unter Zusatz von Zinnchlorür bewerkstelligten, wird nach Cohn (l. c.) besser und rascher mit konzentrierter Salzsäure ohne Zinnsalz ausgeführt.

Seiner Angabe entsprechend wurden 500 g Caseïn mit $1^1/_2$ L Salzsäure (1,19 spez. Gew.) übergossen und im Laufe von $1^1/_2$ Stunden wiederholt durchgeschüttelt, bis der größte Teil mit schmutzig violetter Farbe gelöst war. Dann wurde 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und die erkaltete Flüssigkeit von den ausgeschiedenen Fettsäuren durch Filtration getrennt.

Von hier an bin ich der Vorschrift Cohns, welcher sofort die Salzsäure durch Abdampfen und Behandlung mit Kupferoxydul ent-

---

[1]) Vgl. die vorläufige Anzeige, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 447. (*S. 188.*)

[2]) Willstätter, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 1160 und E. Fischer, ebenda **34**, 454 [1901]. (*S. 211.*)

[3]) Liebigs Annalen **169**, 150 [1873].

fernt, nicht mehr gefolgt, sondern habe zunächst nach dem Vorgange von Hlasiwetz und Habermann die Glutaminsäure durch Kristallisation des Chlorhydrates abgeschieden.

Zu dem Zweck wurde die Flüssigkeit auf etwa $^3/_4$ L eingedampft und in der Kälte mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Sie blieb dann 3 Tage im Eisschrank stehen, wobei die salzsaure Glutaminsäure als dicker Kristallbrei ausfiel. Um sie abfiltrieren zu können, wurde mit dem gleichen Volumen eiskalten Alkohols vermischt und auf der Pumpe abgesaugt. Will man das Salz rein darstellen, so wird es in wenig Wasser gelöst, mit etwas Tierkohle gekocht und mit Chlorwasserstoff wieder abgeschieden. Nach einmaliger Wiederholung dieser Operation ist das Präparat nahezu farblos. Die Ausbeute betrug 50 g, mithin 10% des Caseïns.

Veresterung der Aminosäuren.

Für diese Operation kann direkt das Filtrat von der Glutaminsäure dienen, nur ist es nötig, das darin enthaltene Wasser möglichst vollständig zu entfernen. Zu dem Zweck wird, am besten unter vermindertem Druck, eingedampft, der dunkelbraune, sirupdicke Rückstand mit $1^1/_2$ L absolutem Alkohol durchgerührt und mit gasförmiger Salzsäure, zuletzt unter Erwärmen auf dem Wasserbade, gesättigt. Da bei der Veresterung wieder erhebliche Mengen von Wasser entstehen, welche die Vollständigkeit der Reaktion hindern, so ist es vorteilhaft, von neuem unter vermindertem Druck einzudampfen, wieder in $1^1/_2$ L Alkohol zu lösen und abermals mit Salzsäure zu sättigen. Eine zweite Wiederholung der ganzen Operation steigert noch die Ausbeute an Ester. Jetzt wird die Flüssigkeit der bequemen Handhabung wegen in 4 Portionen geteilt und bei einer 40^0 nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades unter stark vermindertem Druck zum dicken Sirup verdampft. Dieser enthält die Hydrochlorate der Aminoester; um letztere in Freiheit zu setzen, verfährt man folgendermaßen:

Der dicke Sirup wird direkt in dem Destillationskolben ungefähr mit dem halben Volumen Wasser versetzt. Jetzt fügt man zu der sorgfältig mit einer Kältemischung gekühlten Flüssigkeit vorsichtig soviel starke Natronlauge, daß die freie Salzsäure ungefähr neutralisiert ist, und dann eine möglichst konzentrierte Lösung von Kaliumcarbonat und ziemlich viel Äther. Diese erste Operation hat den Zweck, die schwächer basischen Ester der Asparagin- und Glutaminsäure, welche gegen freies Alkali besonders empfindlich sind, abzuscheiden. Nach gutem Durchschütteln wird der Äther abgegossen, durch neuen ersetzt und zu der wiederum sehr sorgfältig gekühlten Masse in verschiedenen

Portionen 33-prozentige Natronlauge und festes Kaliumcarbonat zugegeben. Nach jedesmaligem Zusatz wird kräftig umgeschüttelt, um das Alkali in der steifen Masse zu verteilen und den frei gewordenen Ester sofort in die ätherische Lösung überzuführen.

Es ist vorteilhaft, den Äther mehrmals zu erneuern. Die Menge des Alkalis muß wenigstens so groß sein, daß sie zur Bindung sämtlicher Salzsäure ausreicht, und Kaliumcarbonat ist soviel zuzufügen, daß die Salzmasse einen dicken Brei bildet; denn nur dann werden die in Wasser äußerst leicht löslichen Ester der einfachen Aminosäuren völlig ausgesalzen. Ganz besonders gilt das für die Fälle, wo Glykocoll und Alanin zu isolieren sind.

Die vereinigten ätherischen Auszüge, welche braun gefärbt sind, werden etwa 5 Minuten mit Kaliumcarbonat geschüttelt, dann abgegossen und 12 Stunden mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet, da die übrigen Trockenmittel, wie Ätzkali, Calcium- und Baryumoxyd oder selbst das Kaliumcarbonat, bei längerer Einwirkung etwas Ester zersetzen. Nach dem Verdampfen des Äthers wird der Rückstand bei 8—15 mm Druck über freier Flamme destilliert.

Bis 40° geht in der Regel noch etwas Alkohol über, dann wurden bei einem Versuch, der mit 500 g Caseïn recht sorgfältig durchgeführt war, folgende Fraktionen erhalten:

40— 55°	(bei 10 mm)	7 g
55— 80°	(„ 9 „)	13 „
80—100°	(„ 9 „)	97 „
100—130°	(„ 9 „)	27 „
130—160°	(„ 9 „)	29 „
		173 g.

Längeres Kochen des Caseïns mit Salzsäure ändert an dem Resultat nur wenig. Bei einem Versuche, wo wiederum 500 g Caseïn 36 Stunden mit der Säure gekocht waren, betrug die Gesamtmenge der in Äther löslichen Produkte 280 g und der bis 170° bei 16 mm destillierende Ester 200 g, wobei aber die letzte Fraktion schon erhebliche Mengen von Zersetzungsprodukten enthielt. Die Produkte sind ebenfalls die gleichen wie beim kürzeren Kochen.

Zur weiteren Trennung der Ester wurden mehrere der obigen Fraktionen nochmals einer zweimaligen systematischen Fraktionierung unterworfen und bei 10 mm Druck folgende 8 Präparate aus 1 kg Caseïn gewonnen:

1.	40— 55°	14 g
2.	55— 65°	14 „
3.	65— 80°	25 „

4.	80— 85°	165 g
5.	85—110°	18 ,,
6.	110—120°	40 ,,
7.	120—130°	28 ,,
8.	130—160°	8 ,,
		312 g

Sämtliche Fraktionen sind noch Gemische, die durch weitere Destillation nicht gereinigt werden können. Zur Scheidung in die einzelnen Bestandteile wurden deshalb die Ester in die Aminosäuren zurückverwandelt.

Diese Verseifung läßt sich bei den bis 85° siedenden Produkten, welche nur aus Estern der Monaminosäuren bestehen, am bequemsten durch mehrstündiges Kochen mit Wasser am Rückflußkühler bewerkstelligen. Bei den höher siedenden Teilen, welche Asparagin- und Glutaminsäure enthalten, ist die Verseifung durch Erwärmen mit Barytwasser auszuführen.

Zu beachten ist, daß die Ester sich beim Aufbewahren allmählich zersetzen, und zwar um so rascher, je kleiner das Molekül ist. Es empfiehlt sich deshalb, die Verseifung möglichst bald und zwar bei den niedrigsten Fraktionen schon innerhalb 24 Stunden vorzunehmen.

Fraktion 40—55°.

Wie die Rückverwandlung in die Aminosäuren zeigte, bestand diese Fraktion noch etwa zu zwei Dritteilen aus Alkohol, dessen völlige Entfernung beim Eindampfen der salzsauren Ester nicht möglich ist.

Beim längeren Stehen schied die Flüssigkeit eine amorphe feste Masse ab, welche eine sehr schöne Biuretreaktion gab. Wie ich früher dargelegt habe[1]), wird dadurch die Anwesenheit von Glykocollester sehr wahrscheinlich gemacht. Um denselben als Hydrochlorat zu isolieren, wurde eine Probe der Flüssigkeit in der doppelten Menge absoluten Alkohols gelöst, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt, in einer Kältemischung gekühlt und mit einem winzigen Kriställchen von salzsaurem Glykocollester geimpft. Nach 2 Stunden war in der Tat eine ziemlich erhebliche Kristallisation eingetreten und das Produkt zeigte nach dem Lösen in Alkohol und Fällen mit Äther sowohl den äußeren Habitus wie den Schmelzpunkt (gef. 145° korr.) des salzsauren Glykocollesters. Da aber die Menge im ganzen recht gering war, so halte ich es für wahrscheinlich, daß dieses Glykocoll von einer Verunreinigung des Caseïns herrührt.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 442 [1901]. (*S. 183.*)

Der größte Teil der Fraktion wurde zur Verseifung der Ester mit der fünffachen Menge Wasser 5 Stunden am Rückflußkühler gekocht und die Lösung konzentriert, bis in der Kälte Kristallisation erfolgte. Die erste Kristallisation (0,34 g) gab bei der Analyse Zahlen, welche sich am meisten den für Aminovaleriansäure verlangten Werten nähern.

Gef. C 49,72%, H 9,22%.
Ber. C 51,29%, H 9,40%.

Die Mutterlauge hinterließ beim vollständigen Verdampfen noch 2,5 g Aminosäure. Sie wurde in wenig heißem Wasser gelöst, die in der Kälte ausfallenden Blättchen durch Filtration entfernt, und die Mutterlauge in 400 ccm heißen Alkohol (95%) eingegossen. Die Menge der nach längerem Stehen in der Kälte abgeschiedenen Kristalle betrug 1,2 g. Sie wurden für die Analyse bei 110° getrocknet. Die Zahlen passen recht gut auf Aminopropionsäure.

0,2185 g Substanz gaben 29,4 ccm N (21°, 767,5 mm).
0,1850 „ „ „ 0,2725 g CO_2 und 0,1310 g H_2O.

$C_3H_7O_2N$. Ber. C 40,45%, H 7,86, N 15,73%.
Gef. „ 40,17%, „ 7,87, „ 15,50%.

Das Hydrochlorat drehte nach rechts.

Leider reichte die Menge des Präparates nicht aus, um durch Darstellung von Derivaten die Identität mit dem Alanin festzustellen. Ich halte deshalb die Wiederholung des Versuches mit größeren Mengen für nötig.

Fraktion 55—65°.

Diese Fraktion enthält Aminovaleriansäure und zwar, wie es scheint, als Hauptbestandteil. Der Ester wurde durch Kochen mit Wasser verseift und die Aminosäuren zunächst ins Kupfersalz verwandelt. Nachdem der schwerer lösliche Teil des Salzes, welcher übrigens den Metallgehalt des aminovaleriansauren Kupfers schon besaß (gefunden: Cu 21,51%, berechnet: 21,49%), entfernt war, wurde die Aminosäure regeneriert und zweimal aus Wasser umkristallisiert. Die so enthaltenen farblosen glänzenden Blättchen gaben nach dem Trocknen bei 100° Zahlen, welche ziemlich gut auf Aminovaleriansäure stimmen. Leider reichte infolge eines großen Verlustes die Menge für eine ausführliche Untersuchung nicht aus, aber ich zweifle nicht daran, daß das Produkt mit der sogleich näher zu beschreibenden Aminovaleriansäure identisch war.

0,2000 g Substanz gaben 0,3689 g CO_2 und 0,1673 g H_2O.

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28%, H 9,40%.
Gef. „ 51,47%, „ 9,39%.

Fraktion 65—80°.

Neben kleinen Mengen von Leucin und Pyrrolidincarbonsäure findet sich auch hier Aminovaleriansäure, aber ihre Isolierung und Reinigung ist so schwierig, daß es nicht möglich war, genügendes Material zu beschaffen, um ihre Konstitution aufzuklären.

Zunächst wurde das Gemisch der Ester durch Kochen mit der 5-fachen Menge Wasser in der gleichen Weise wie die Fraktion 80—85° verseift. Das Gewicht der Aminosäuren betrug 12 g. 10 g wurden in 2 L Wasser gelöst und 1 Stunde mit überschüssigem gefällten Kupferoxyd gekocht. Das Filtrat schied beim Eindampfen ziemlich bald ein schwer lösliches Kupfersalz ab, welches mehrmals abgehoben und mit wenig Wasser ausgekocht wurde, wobei die Laugen zur ursprünglichen Lösung zurückgegeben wurden. Die Menge des schwer löslichen Kupfersalzes betrug 2,1 g und die Bestimmung des Kupfergehaltes deutete auf ein Gemisch von etwa gleichen Teilen Leucin und Aminovaleriansäure. Das Filtrat hinterließ beim Verdampfen die leicht löslichen Kupfersalze. Beim Auskochen mit absolutem Alkohol gingen davon 0,9 g in Lösung, welche wohl im wesentlichen *l*-pyrrolidincarbonsaures Kupfer waren.

Der in Alkohol unlösliche Teil wurde dann mehrmals mit ungefähr 100 ccm Wasser bei 70—80° ausgelaugt, wobei wieder 0,8 g schwer lösliches Kupfersalz zurückblieb. Die wässerige Lösung wurde mit Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit, zur Trockne verdampft und der Rückstand mit 25 ccm absolutem Alkohol ausgekocht. Dabei ging die racemische Pyrrolidincarbonsäure in Lösung, ihre Menge betrug 1,5 g.

Der in Alkohol unlösliche Teil wurde in Wasser gelöst, mit etwas Tierkohle gekocht und das eingeengte Filtrat mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Dabei schieden sich 2,5 g Aminosäure ab, welche folgende Zahlen gab:

0,1885 g Substanz lieferten 0,3444 g CO_2 und 0,1561 g H_2O.

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28%, H 9,40%.
Gef. „ 49,83%, „ 9,20%.

Man ersieht daraus, daß das Präparat noch keineswegs reine Aminovaleriansäure war. In 20-prozentiger Salzsäure gelöst gab es $[\alpha]_D^{20} = +27,1^0$. Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz in 20 ccm kochendem Wasser gelöst und mit 40 ccm Alkohol wieder gefällt. Die so erhaltenen schönen glänzenden Blättchen schmolzen in geschlossenem Kapillarrohr unter Gasentwicklung bei 292—295° (korr.). Nach der Analyse war auch dieses Präparat keine ganz reine Aminovaleriansäure.

0,2110 g Substanz gaben 0,3891 g CO_2 und 0,1728 g H_2O.

Gef. C 50,30%, H 9,10%.

Zur weiteren Charakterisierung wurde deshalb die Aminosäure zuerst racemisiert und dann mit Phenylcyanat gekuppelt. Das erstere geschah durch 24-stündiges Erhitzen mit der dreifachen Menge Barythydrat und der 20-fachen Menge Wasser auf 175°. Die in der üblichen Weise abgeschiedene Aminosäure bildete glänzende Blättchen, welche sich von dem *dl*-Leucin durch ihre viel größere Löslichkeit in kaltem Wasser unterschieden.

1 g von dem Präparate wurde in 10 ccm Normal-Natronlauge gelöst und bei 0° unter kräftigem Schütteln tropfenweise mit Phenylcyanat so lange versetzt, bis eine Abscheidung von Diphenylharnstoff stattfand.

Aus dem alkalischen Filtrat fiel beim Ansäuern die Phenylcyanatverbindung als zähes Harz aus, welches aber bald kristallinisch erstarrte.

Aus heißem 50-prozentigen Alkohol kristallisierte das Produkt in glänzenden, oft sechsseitigen Blättchen, welche bei 157—158° unter Zersetzung schmolzen.

Schöner als die Phenylcyanatverbindungen selbst sind in der Regel ihre Anhydride, das trifft auch im vorliegenden Falle zu. Zur Bereitung des Anhydrids wurde in der bekannten Weise die Verbindung in der hundertfachen Menge 20-prozentiger heißer Salzsäure gelöst, eine halbe Stunde gekocht und dann die Flüssigkeit auf etwa $^1/_3$ Volumen eingedampft. Beim Erkalten schieden sich farblose, zu Büscheln gruppierte Nadeln ab, welche zur Analyse nochmals aus siedendem Wasser umkristallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

0,1838 g Substanz gaben 0,4456 g CO_2 und 0,1100 g H_2O.
0,1777 „ „ „ 19,7 ccm N (22°, 767 mm).

$C_{12}H_{14}O_2N_2$. Ber. C 66,05%, H 6,42%, N 12,84%.
Gef. „ 66,12%, „ 6,62%, „ 12,72%.

Die erhaltenen Zahlen stimmen recht gut auf die Formel $C_{12}H_{14}N_2O_2$. Das würde dem Phenylhydantoïnderivat einer α-Aminovaleriansäure von folgender Struktur

$$\begin{array}{l} C_6H_5N\text{—}CO \\ \quad | \qquad\quad \rangle NH \\ \quad CO\text{—}CH\text{—}CH_2\text{—}CH_2\text{—}CH_3 \end{array}$$

oder einer isomeren Verbindung entsprechen.

Das Präparat schmolz auch nach mehrmaligem Umkristallisieren bei 117° (korr.), aber vielfältige Erfahrung hat mich gelehrt, daß Konstanz des Schmelzpunktes bei solchen Derivaten der Aminosäuren keine Garantie für die Reinheit ist, und so kann ich auch im vorliegen-

den Falle für die Einheitlichkeit des Präparates nicht einstehen, zweifle aber nicht daran, daß es der Hauptmenge nach das Derivat einer Aminovaleriansäure ist.

Untersuchung der Fraktion 80—85°.

Das Produkt ist in kaltem Wassser leicht löslich, scheidet sich aber beim Erwärmen der konzentrierten Lösung zum Teil wieder ölig ab. Seine spezifische Drehung war +5,8°.

80 g wurden mit der 10fachen Menge Wasser 6—7 Stunden gekocht, bis das Öl gänzlich und die alkalische Reaktion der Flüssigkeit nahezu verschwunden war. Durch successives Eindampfen und Erkaltenlassen der Lösung resultierten 3 Kristallisationen von 14, 9 und 8 g. Eine 4. Kristallisation wurde dann aus dem Filtrat durch Zusatz der gleichen Menge Alkohol gewonnen. Die Mutterlaugen dienten, wie später beschrieben wird, zur Isolierung der beiden isomeren Pyrrolidincarbonsäuren.

Die 4 Kristallisationen bestehen zum allergrößten Teile aus Aminocapronsäuren und enthalten wahrscheinlich eine kleine Menge von Aminovaleriansäure. Um diese abzutrennen, wurden durch Umkristallisieren 7 Fraktionen hergestellt, welche auf ihr optisches Drehungsvermögen in 20-prozentiger Salzsäure untersucht sind.

A.	4,7 g	$[\alpha]_D^{20^\circ}$	= +12,0°
B.	6,5 ,,	,,	= +22,4°
C.	3,7 ,,	,,	= +21,7°
D.	6,7 ,,	,,	= +23,1°
E.	7,0 ,,	,,	= +27,3°
F.	6,5 ,,	,,	= +29,0°
G.	6,0 ,,	,,	
	41,1 g.		

Die Fraktionen A und D wurden analysiert und zeigten die Zusammensetzung der Aminocapronsäure. Daß sie aber ebensowenig wie die zwischenliegenden Teile B und C einheitliche Präparate sind, zeigt das Schwanken des Drehungsvermögens. Unzweifelhaft bestehen sie zum größten Teil aus dem gewöhnlichen Leucin, welches in der ersten Fraktion zum Teil als racemische Form vorhanden ist. Für das aktive Leucin wird nun allerdings eine spezifische Drehung von +17,5° von Schulze angegeben, und solange dieser Wert nicht als zu niedrig erkannt ist, muß man annehmen, daß in der Fraktion D und höchst wahrscheinlich auch in B und C eine gleich zusammengesetzte, aber stärker drehende Aminosäure enthalten ist. Ihre Iso-

lierung mit Hilfe des Kupfersalzes oder der Phenylcyanatverbindung habe ich vergeblich versucht.

Die Fraktionen F und G sind Gemische von Leucin und Aminovaleriansäure. Man hätte erwarten sollen, daß diese beiden Säuren sich durch die Kupfersalze trennen ließen, da deren Löslichkeit in Wasser recht verschieden ist. Leider haben aber beide Salze die Neigung, zusammen zu kristallisieren. Man erhält gerade aus diesem Gemisch häufig prachtvoll dunkelblaue große blätterige Kristalle, die in heißem Wasser viel leichter löslich sind als Leucinkupfer. Ihre Analyse stimmt ungefähr auf ein Gemisch von gleichen Molekülen Leucinkupfer und aminovaleriansaurem Kupfer nebst einem Molekül Wasser:

0,4372 g lufttrockenes Salz verloren bei 110° 0,0244 g Wasser.

$C_{11}H_{22}O_4N_2Cu + H_2O$. Ber. H_2O 5,50%.
Gef. „ 5,58%.

0,1984 g wasserfreies Salz gaben 0,3066 g CO_2 und 0,1276 g H_2O.
0,1960 „ „ „ „ 15,3 ccm N (17°, 750 mm).
0,2685 „ „ „ „ 0,0698 g CuO.

$C_{11}H_{22}O_4N_2Cu$. Ber. C 42,58%, H 7,10, N 9,0%, Cu 20,48%.
Gef. „ 42,15%, „ 7,14, „ 8,99%, „ 20,77%.

Ob hier eine wirkliche molekulare Verbindung oder nur Mischkristalle vorliegen, habe ich nicht weiter geprüft.

Die Isolierung der Aminovaleriansäure wurde hier besonders durch den Umstand erschwert, daß neben aktiven Säuren stets kleinere und wechselnde Mengen der Racemkörper vorhanden sind. In solchen Fällen ist es nach meiner Erfahrung ratsam, durch ein- bis zweitägiges Erhitzen mit überschüssigem Barytwasser auf 160—170° im Autoklaven, wobei Glasgefäße zu vermeiden sind, völlig zu racemisieren, und dann erst die Trennung der einzelnen Aminosäuren durch Kristallisation oder durch die Kupfersalze vorzunehmen.

Ich habe diese Operation, speziell zur Isolierung der Aminovaleriansäure, mit dem rohen Gemisch der Aminosäuren, welches aus dem Ester der Fraktion 80—85° entsteht, vorgenommen. Das racemisierte Produkt wurde dann durch Kristallisation aus Wasser in 3 Fraktionen geteilt.

Die leicht lösliche Fraktion wurde zur Entfernung der Pyrrolidincarbonsäure mehrmals mit absolutem Alkohol ausgekocht, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Das so erhaltene Produkt, dessen Menge ungefähr 5% des ursprünglichen Esters betrug, diente zur Darstellung der Phenylcyanatverbindung bzw. dessen Anhydrid. Die Analyse des letzteren gab Zahlen, welche auf das Derivat der Aminovaleriansäure stimmen.

0,1772 g Substanz gaben 0,4282 g CO_2 und 0,1065 g H_2O.
0,1085 „ „ „ 12,4 ccm N (24⁰, 763 mm).

$C_{12}H_{14}O_2N_2$. Ber. C 66,06%, H 6,42%, N 12,85%.
Gef. „ 65,90%, „ 6,68%, „ 12,97%.

Aber der Schmelzpunkt des Produktes 109⁰ lag 8⁰ niedriger als bei dem entsprechenden Präparat, welches aus der Fraktion 65—80⁰ gewonnen war.

Die obenerwähnten wässerig-alkoholischen Mutterlaugen, welche neben gewöhnlichen Aminosäuren die beiden Pyrrolidincarbonsäuren enthalten, wurden nach Wegdampfen des Alkohols etwa auf 1/2 Liter verdünnt und mit überschüssigem gefällten Kupferoxyd 1 1/2 Stunden gekocht. Beim Verdampfen des Filtrats blieben 28 g Kupfersalz zurück. Sie wurden fein gepulvert und zweimal mit je 100 ccm heißem absoluten Alkohol ausgelaugt. Ungelöst blieben 10 g, und aus dem Filtrat fielen beim Erkalten noch 2 g aus, welche dann in Alkohol sehr schwer löslich waren.

Das unlösliche Kupfersalz enthält hauptsächlich die racemische α-Pyrrolidincarbonsäure. Es wurde mit 300 ccm Wasser ausgekocht, von einer kleinen Menge Rückstand filtriert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat im Vakuum zur Trockne verdampft. Beim Auslaugen des Rückstandes mit 40 ccm heißem absoluten Alkohol, welcher die Pyrrolidincarbonsäure leicht löst, blieben 1,8 g Aminosäure zurück, welche nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser analysiert wurden:

0,1993 g Substanz gaben 0,3838 g CO_2 und 0,1717 g H_2O.

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28%, H 9,40%.
$C_6H_{13}O_2N$. „ „ 54,96%, „ 9,92%.
Gef. „ 52,52%, „ 9,58%.

Die Zahlen deuten auf ein Gemisch von etwa 2/3 Aminovaleriansäure und 1/3 Aminocapronsäure.

Als bei einem späteren Versuch die entsprechende Substanz einmal aus Wasser und dann aus Wasser unter Zusatz von Alkohol umkristallisiert wurde, ergab die Analyse folgende Zahlen:

0,1885 g Substanz gaben 0,3559 g CO_2 und 0,1603 g H_2O.
0,1670 „ „ „ 17,0 ccm N (21,5⁰, 761,5 mm).

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28%, H 9,40%, N 11,95%.
Gef. „ 51,49%, „ 9,45%, „ 11,69%.

Die in der alkoholischen Lösung befindliche Pyrrolidincarbonsäure war nunmehr so gut wie frei von gewöhnlichen Aminosäuren. Sie wurde nach dem Verdampfen des Alkohols ins Kupfersalz zurück-

verwandelt und dies in 2 Fraktionen (3,8 + 1,4 g) zerlegt. Die erste Fraktion diente für die Analyse.

1,2576 g lufttrockenes Salz verloren bei 108° 0,1381 g.
0,2210 g Substanz gaben 0,3325 g CO_2 und 0,1107 g H_2O.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$. Ber. H_2O 10,99%.
Gef. „ 10,97%.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$. Ber. C 41,16%, H 5,49%.
Gef. „ 41,03%, „ 5,56%.

Die aus dem Salz in Freiheit gesetzte Säure gab nach einmaligem Umkristallisieren und Trocknen bei 40° im Vakuum folgende Zahlen:

0,1939 g Substanz gaben 0,3706 g CO_2 und 0,1307 g H_2O.

$C_5H_9O_2N$. Ber. C 52,18%, H 7,83%.
Gef. „ 52,12%, „ 7,88%.

Die Substanz zeigte ganz das Verhalten der gewöhnlichen Pyrrolidincarbonsäure, wie es von Willstätter[1]) und dann von mir[2]) an den synthetischen Produkten gefunden wurde.

l-Pyrrolidincarbonsäure.

Ihr Kupfersalz ist in dem obenerwähnten alkoholischen Auszug enthalten und bleibt beim Verdampfen desselben als tiefblaue amorphe Masse zurück.

Es wurde in Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand zweimal mit absolutem Alkohol, im ganzen 100 ccm, ausgekocht. Hierbei blieben 1,2 g gewöhnliche Aminosäure zurück, welche von der Pyrrolidincarbonsäure durch den viel höheren Schmelz- bzw. Zersetzungspunkt leicht zu unterscheiden ist. Das Rohprodukt enthielt 0,5% C mehr, als für Aminovaleriansäure verlangt wird. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser, darauf aus Alkohol, gab die bei 125° getrocknete Substanz folgende Zahlen:

0,2000 g Substanz lieferten 0,3763 g CO_2 und 0,1677 g H_2O.
0,1668 „ „ „ 17,4 ccm N (20,5°, 754 mm).

$C_5H_{11}O_2N$. Ber. C 51,28%, H 9,40%, N 11,95%.
Gef. „ 51,31%, „ 9,32%, „ 11,95%.

Die Lösung, welche in 4,7782 g Salzsäure (20%) 0,2673 g Aminosäure, mithin 5,594% enthielt und ein spezifisches Gewicht von 1,10 besaß, drehte im Dezimeterrohr bei 20° Natriumlicht 1,72° nach rechts.

$$[\alpha]_D^{20^0} = +27,95^0.$$

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 1160 [1900].
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **34**, 458 [1901]. (*S. 215.*)

In geschlossener Kapillare schmolz die Substanz unter starker Gasentwicklung bei 285—286° (292—293° korr.).

Das alkoholische Filtrat von der Aminovaleriansäure hinterließ beim raschen Verdampfen die aktive Pyrrolidincarbonsäure als schwach gelbgefärbte kristallinische Masse. Die Ausbeute betrug 8,5 g.

Zur weiteren Reinigung wurde die Säure entweder in heißem Alkohol gelöst und nach Zusatz von Äther der Kristallisation überlassen oder in wenig Wasser gelöst, nach Zusatz von Pyridin mit wenig Tierkohle gekocht und das Filtrat noch etwas eingeengt. Im letzteren Falle schieden sich hübsche flache Nadeln ab, welche aber beim späteren Trocknen an der Luft verwitterten. Schließlich wurde das zuletzt genannte Präparat noch einmal aus Alkohol durch Eindunsten umkristallisiert. Bei der Analyse gaben die drei Präparate folgende Werte:

I. Getrocknet bei 110°:

0,1777 g Substanz lieferten 18,2 ccm N (18°, 765 mm).
0,1985 „ „ „ 0,3713 g CO_2 und 0,1415 g H_2O.

Gef. C 51,01%, H 7,92%, N 11,91%.

II. Getrocknet im Vakuum über Schwefelsäure:

0,2022 g Substanz lieferten 0,3795 g CO_2 und 0,1437 g H_2O.
0,1719 „ „ „ 0,3224 „ „ „ 0,1210 „ „

Gef. C 51,19%, H 7,89%.
„ „ 51,15%, „ 7,89%.

III. Getrocknet im Vakuum bei 40°:

0,1950 g Substanz lieferten 0,3705 g CO_2 und 0,1403 g H_2O.

Gef. „ 51,82%, „ 7,99%. —
$C_5H_9O_2N$. Ber. C 52,18%, H 7,83%, N 12,17%.

Infolge der schwierigen Reinigung haben auch die optischen Bestimmungen schwankende Werte ergeben, und ich halte es für möglich, daß selbst die höchste gefundene Zahl noch etwas zu niedrig ist.

I. Getrocknet über Phosphorsäureanhydrid im Vakuum. 4,5681 g wässerige Lösung, welche 0,4016 g Substanz, mithin 8,792% enthielt und das spezifische Gewicht 1,023 besaß, drehte im Dezimeterrohr bei 20° Natriumlicht 6,47° nach links.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -71,94^\circ.$$

II. 4,5192 g wässerige Lösung, welche 0,4061 g Substanz, mithin 8,986% enthielt und das spezifische Gewicht 1,024 besaß, drehte im Dezimeterrohr bei 20° Natriumlicht 6,83° nach links.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -74,22^\circ.$$

III. 10,9570 g wässerige Lösung, welche 0,8094 g Substanz, mithin 7,39% enthielt und das spezifische Gewicht 1,02 besaß, drehte im 2-Dezimeterrohr bei 20⁰ Natriumlicht 11,67⁰ nach links.

$$[\alpha]_D^{20^0} = -77{,}40^0.$$

Der letzte Wert entspricht dem reinsten Präparat und ist deshalb am wahrscheinlichsten.

Von einem Präparat, welches in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20^0} = -72{,}64^0$ zeigte, wurde noch die Drehung in salzsaurer und in alkalischer Lösung bestimmt, um den Vergleich mit anderen Aminosäuren unter diesen Bedingungen zu ermöglichen.

Die Lösung in 20-prozentiger Salzsäure, welche in 4,5904 g 0,3526 g Substanz, mithin 7,682% enthielt und das spezifische Gewicht 1,118 besaß, drehte im Dezimeterrohr bei 20⁰ Natriumlicht 4,00⁰ nach links.

$$[\alpha]_D^{20^0} = -46{,}53^0.$$

Die alkalische Lösung (3 ccm Normal-Kalilauge + Wasser), welche in 5,5106 g 0,3157 g Substanz, also 5,729% enthielt und das spezifische Gewicht 1,035 besaß, drehte im Dezimeterrohr bei 20⁰ Natriumlicht 4,95⁰ nach links.

$$[\alpha]_D^{20^0} = -83{,}48^0.$$

Die Zahlen sind selbstverständlich nicht ganz genau, genügen aber zur vorläufigen Orientierung.

Beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr schmolzen alle drei Präparate unter starker Gasentwicklung bei 203—206⁰ (206—209⁰ korr.). Dabei tritt, ebenso wie beim Eindampfen des Kupfersalzes der charakteristische Geruch des Pyrrolidins auf.

Der endgültige Beweis, daß hier aktive α-Pyrrolidincarbonsäure vorliegt, wurde überdies noch durch Verwandlung in die inaktive Form geliefert. Die Racemisierung war nach 5-stündigem Erhitzen von 1 g Säure mit 2 g kristallisiertem Barythydrat und 4 g Wasser auf 140—145⁰ beendet. Nach der Fällung des Baryts mit Kohlensäure wurde das Kupfersalz dargestellt, welches jetzt in Alkohol völlig unlöslich war und aus Wasser kristallisiert die Zusammensetzung des α-pyrrolidincarbonsauren Kupfers hatte:

0,2404 g lufttrockenes Salz verloren bei 110⁰ 0,0260 g an Gewicht und lieferten darnach 0,0594 g CuO.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$.	Ber. H_2O 10,99%.
	Gef. „ 10,81%.
$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$.	Ber. Cu 21,81%.
	Gef. „ 22,13%.

Um die aktive Säure durch ein besser kristallisiertes Derivat zu charakterisieren, habe ich noch ihre Verbindung mit Phenylisocyanat bzw. deren Anhydrid dargestellt. Zu dem Zweck wurden 1,8 g der *l*-Pyrrolidincarbonsäure in 15 ccm Normal-Natronlauge gelöst und nach guter Abkühlung 2 g Phenylisocyanat in kleinen Portionen unter dauerndem kräftigen Schütteln zugefügt. Zum Schluß wird die Lösung mit etwas Tierkohle durchgeschüttelt, filtriert und angesäuert, wobei die Phenylcyanatverbindung als harzige Masse ausfällt. Da sie wenig Neigung zum Kristallisieren hat, so fügt man noch so viel Salzsäure zu, daß die Lösung etwa 4% davon enthält, und engt auf dem Wasserbade ein, wobei an Stelle des ursprünglichen Öles die Kristalle des Anhydrids treten. Diese werden nach dem Erkalten filtriert und aus etwa 200 ccm kochendem Wasser umkristallisiert. Die Substanz ist sofort rein und die Ausbeute recht befriedigend.

In warmem Alkohol und Aceton ist sie erheblich leichter löslich als in Wasser, in Äther ist sie schwerer löslich. Sie kristallisiert aus diesen Flüssigkeiten meist in kleinen Prismen. Aus heißem Wasser, wovon etwa 110 Teile zur Lösung nötig sind, fällt sie beim Erkalten in hübschen flachen Nadeln, welche bei 143° (144° korr.), mithin erheblich höher als die inaktive Verbindung (118°) schmelzen.

Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz gab folgende Zahlen:

0,1952 g Substanz gaben 0,4770 g CO_2 und 0,0968 g H_2O.
0,1960 „ „ „ 21,4 ccm N (17°, 769 mm).

$C_{12}H_{12}O_2N_2$. Ber. C 66,67%, H 5,57%, N 12,96%.
Gef. „ 66,64%, „ 5,51%, „ 12,83%.

Bezüglich der Struktur verweise ich auf das beim Racemkörper Gesagte, will aber hier der Bequemlichkeit halber die Formel anführen:

```
CH2—CH2
|    |
CH2  CH——CO
 \  /     |
  N—CO—N—C6H5 .
```

Wegen ihrer schönen Eigenschaften ist die Verbindung zur Erkennung der aktiven α-Pyrrolidincarbonsäure recht geeignet.

Die Menge der Pyrrolidincarbonsäure, welche aus dem Caseïn entsteht, ist keineswegs gering, denn bei Anwendung von 500 g des letzteren konnten allein aus der von 80—85° siedenden Fraktion der Ester 10 g aktive und 4 g racemische Säure isoliert werden. Aus der nächst niederen Fraktion wurden noch weitere 2 g gewonnen. Die Gesamtmenge der Säure betrug mithin 3,2% des Caseïns.

Wegen ihrer leichten Löslichkeit in Wasser und Alkohol ist sie allen früheren Beobachtern, welche sich mit der Spaltung des Caseïns beschäftigt haben, entgangen. Auch bei anderen Proteïnstoffen ist die Säure bisher nicht gefunden worden. Zwar gibt Schützenberger an, daß er aus Albumin durch Spaltung mit Barytwasser unter Druck ungesättigte Aminosäuren von der allgemeinen Formel $C_nH_{2n-1}NO_2$, die sogenannten Leuceïne erhalten habe. Aber er hat keinen dieser Stoffe als chemisches Individuum charakterisiert. Er schließt vielmehr auf ihre Existenz aus der Analyse von Präparaten, die nach ihrer Gewinnungsweise meiner Erfahrung gemäß nur Gemische gewesen sein können, und ich habe in keiner seiner Angaben auch nur eine Andeutung finden können, daß er die Pyrrolidincarbonsäure unter den Händen hatte.

Schwieriger ist die Frage zu entscheiden, ob die Säure ein primäres Spaltungsprodukt des Caseïns ist; denn man kann sich auch wohl vorstellen, daß sie unter dem Einfluß der Salzsäure sekundär aus einem 1,4 Derivat der Valeriansäure durch Ringschluß entstehe. Ich habe zunächst an das Arginin gedacht, welches durch Abspaltung der Guanidingruppe in Pyrrolidincarbonsäure übergehen könnte, und deshalb folgenden Versuch ausgeführt:

1 g Argininnitrat, welches mir von Herrn E. Schulze freundlichst zur Verfügung gestellt war, wurde zuerst mit $1^1/_2$ Molekülen Schwefelsäure in verdünnter wässeriger Lösung versetzt und mehrmals unter vermindertem Druck abdestilliert, um die Salpetersäure zu entfernen. Dann wurde das Sulfat mit 20 ccm rauchender Salzsäure erst 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und schließlich genau in derselben Weise wie die Caseïnlösung auf die Ester der Aminosäuren verarbeitet. Da unter diesen Bedingungen gar kein in Äther löslicher Ester erhalten wurde, so war offenbar keine Pyrrolidincarbonsäure gebildet worden.

Ebensowenig gelang es, das Ornithin in Pyrrolidincarbonsäure zu verwandeln.

Für den Versuch diente synthetische Ornithursäure. 1,5 g wurden mit 30 ccm Salzsäure (25%) 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht, nach dem Abkühlen von der Benzoësäure abfiltriert, noch 5 Stunden gekocht, verdampft und der Rückstand zur Entfernung der Benzoësäure mit Äther behandelt. Der zurückbleibende Sirup wurde dann in der üblichen Weise verestert. Es resultierte dabei in der Tat ein in Äther lösliches Produkt, welches nach dem Verjagen des Äthers durch Kochen mit Wasser verseift und auf Kupfersalz verarbeitet wurde. Beim Eindampfen der grünen Kupfersalzlösung trat allerdings ein stark basischer Geruch auf, welcher demjenigen des Pyrro-

lidins ähnlich war, aber ebensogut von Tetramethylendiamin herrühren konnte. Das Kupfersalz war indessen nicht allein durch die Farbe, sondern auch durch die außerordentlich leichte Löslichkeit in kaltem Wasser von dem Salz der racemischen Pyrrolidincarbonsäure verschieden. Ich glaube deshalb annehmen zu dürfen, daß Pyrrolidincarbonsäure in irgendwie erheblicher Menge bei dem Versuch nicht entstanden war.

Um die Frage auch noch von einer anderen Seite her in Angriff zu nehmen, habe ich in Gemeinschaft mit Herrn Dr. P. A. Levene einige Versuche über die Spaltung des Caseïns mit Trypsin angestellt, bei welchen die Salzsäure nur in alkoholischer Lösung zur Veresterung der Aminosäuren in Anwendung kam. Da auch hier die Entstehung von Pyrrolidincarbonsäure beobachtet wurde, so halte ich es nach allen bisher vorliegenden Erfahrungen für sehr wahrscheinlich, daß sie ein primäres Spaltungsprodukt ist.

Da hierdurch die Verbindung, welche zum Unterschied von allen bisher aus Eiweißkörpern durch Hydrolyse erhaltenen Aminosöuren einen stickstoffhaltigen Ring enthält, ein erhöhtes Interesse gewinnt, so habe ich die Absicht, noch eine Reihe anderer Protëinstoffe in der gleichen Art zu prüfen. Nach Versuchen des Herrn Dr. Georg Franz kann ich schon jetzt erwähnen, daß das käufliche Blutfibrin bei der Spaltung mit Salzsäure gleichfalls Pyrrolidincarbonsäure liefert.

Die Fraktion 85—110°, deren Menge relativ klein war, enthielt noch etwas Leucin neben anderen Produkten, die nicht näher untersucht sind.

Fraktion 110—120°.

Da dieselbe erhebliche Mengen Asparaginsäureester enthält, welcher beim Kochen mit Wasser eine komplexe Zersetzung erfährt, so wurde zur Verseifung mit überschüssigem, etwa 20-prozentigem Barytwasser auf dem Wasserbade erhitzt. Nach kurzer Zeit begann die Abscheidung eines schwach gelb gefärbten kristallinischen Barytsalzes. Je nach dem Überschuß von Baryt ist die Verseifung in 1—2 Stunden beendet. Man läßt dann erkalten und filtriert das abgeschiedene Salz. Dasselbe ist asparaginsaurer Baryt. Die daraus in bekannter Weise isolierte Asparaginsäure gab folgende Zahlen:

0,1987 g Substanz lieferten 0,2617 g CO_2 und 0,0973 g H_2O.

$C_4H_7O_4N$. Ber. C 36,09%, H 5,26%.
Gef. „ 35,92%, „ 5,40%.

Es verdient hervorgehoben zu werden, daß die Säure zum größeren Teile racemisiert war. Die Lösung in Salzsäure (10%), welche 8,175% Substanz enthielt und das spezifische Gewicht 1,05 besaß, drehte im

2-Dezimeterrohr bei 20° Natriumlicht 1,31° nach rechts. Also $[\alpha]_D^{20°}$ = +7,63, während die reine aktive Asparaginsäure unter den gleichen Bedingungen +26,5° gab[1]). Die Substanz enthielt also nur 29% aktiver Säure. Dadurch erklärt sich auch die leichte Abscheidung des Barytsalzes, denn das neutrale Salz der aktiven Säure ist in heißem Wasser sehr leicht löslich und kommt unter den Bedingungen des obigen Versuches kaum zur Abscheidung.

Die vom Barytsalz abfiltrierte Mutterlauge wurde mit Schwefelsäure vom Baryt befreit und verdampft. Sie enthielt außer Asparaginsäure noch leicht lösliche Aminosäuren, über deren Natur ich vorläufig nichts sagen kann.

Die Fraktion 120—130° enthält viel Asparaginsäure, wahrscheinlich auch kleine Mengen Glutaminsäure, und außerdem in Wasser sehr leicht lösliche Stoffe, die beim Eindampfen einen eigentümlichen, an Fleischextrakt erinnernden Geruch geben und wahrscheinlich serinähnliche Stoffe sind. Ich beabsichtige, dieselben noch zu untersuchen. Ferner ist in dieser Fraktion der Ester des Phenylalanins vorhanden.

Um ihn von den leicht löslichen Estern der Glutamin- und Asparaginsäure zu trennen, wird das Gemisch mit der 7fachen Menge kaltem Wasser geschüttelt, das ausgeschiedene Öl am besten durch Filtration auf einem nassen Papierfilter abgetrennt und noch zweimal mit der 3fachen Menge Wasser gewaschen. Zur Umwandlung in Phenylalanin wird der rohe Ester mit der doppelten Menge Barythydrat und der 10fachen Menge Wasser unter häufigem Umschütteln mehrere Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Dabei bleibt ein Teil des Öls ungelöst, das sind Produkte unbekannter Zusammensetzung. Aus der wässerigen Lösung wird der Baryt quantitativ mit Schwefelsäure gefällt und beim Verdampfen bleibt dann das Phenylalanin als fast farblose, meist aus Blättchen bestehende Kristallmasse zurück. Seine völlige Reinigung bietet besondere Schwierigkeiten. Ein mehrmals aus Wasser umkristallisiertes Präparat gab folgende Zahlen, welche noch auf eine merkliche Verunreinigung hindeuten:

0,1811 g Substanz lieferten 0,4300 g CO_2 und 0,1087 g H_2O.
0,1646 „ „ „ 11,9 ccm N (15°, 761 mm).

$C_9H_{11}O_2N$. Ber. C 65,42%, H 6,66%, N 8,48%.
Gef. „ 64,76%, „ 6,69%, „ 8,46%.

Zudem ist das Präparat ein Gemisch von racemischem und aktivem Phenylalanin, deren Mengenverhältnis selbstverständlich bei verschiedenen Kristallisationen variiert. Die aktive Form ist die *l*-Ver-

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2463 [1899]. (*S. 100.*)

bindung, mithin die gleiche, welche E. Schulze zuerst in verschiedenen pflanzlichen Proteïnstoffen gefunden hat. Dementsprechend dreht die wässerige Lösung des Gemisches nach links, aber die Stärke der Drehung schwankt. Ein ähnliches Resultat gab die Untersuchung der Phenylisocyanatverbindung. Auch hier waren Schmelzpunkt und Drehungsvermögen nicht konstant. Für ein Präparat, welches bei 164° (166 korr.) schmolz, waren die Zahlen folgende:

4,4599 g Lösung, welche 1,4 ccm Normal-Kalilauge und 0,3647 g Substanz, mithin 8,18% enthielt und das spezifische Gewicht 1,03 besaß, drehte im Dezimeterrohr bei 20° Natriumlicht 4,16° nach rechts. $[\alpha]_D^{20°} = +49,35°$, während das Drehungsvermögen des reinen Phenylisocyanat-*l*-phenylalanins +61,3 sein müßte[1]).

Ein anderes Präparat des Phenylisocyanatkörpers wurde für die Analyse verwendet:

0,2006 g Substanz lieferten 0,4974 g CO_2 und 0,1034 g H_2O.
$C_{16}H_{16}O_3N_2$. Ber. C 67,60%, H 5,63%.
Gef. „ 67,62%, „ 5,73%.

Da aber immer noch Differenzen im Schmelzpunkt mit den genau untersuchten synthetischen Produkten vorhanden waren, so wurde schließlich das Phenylalanin aus Caseïn durch 48stündiges Erhitzen mit der 3-fachen Menge Barythydrat und der 20-fachen Menge Wasser auf 155—160° völlig racemisiert. Nach Fällung des Baryts mit Schwefelsäure und Eindampfen der Lösung schied sich jetzt das racemische Phenylalanin in glänzenden Blättchen ab, welche bekanntlich viel schwerer löslich sind als die aktive Form. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser enthielt die bei 100° getrocknete Substanz noch etwas zu wenig Kohlenstoff:

0,1781 g Substanz gaben 0,4242 g CO_2 und 0,1087 g H_2O.
$C_9H_{11}O_2N$. Ber. C 65,42%, H 6,66%.
Gef. „ 64,96%, „ 6,78%.

Die aus diesem Präparat hergestellte Phenylisocyanatverbindung zeigte dann in Kristallform und Schmelzpunkt (gef. 180—181° korr.) völlige Übereinstimmung mit dem synthetischen Produkt. Dasselbe traf auch noch zu für das durch Kochen mit Salzsäure entstehende Anhydrid. Dadurch werden die letzten Zweifel an der Entstehung von Phenylalanin aus Caseïn beseitigt.

---

[1]) Die Bestimmung wurde bisher nur mit der *d*-Verbindung ausgeführt (E. Fischer u. A. Mouneyrat, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2386). Leider ist hier durch ein Versehen die Drehungsrichtung falsch angegeben. Ich habe den Versuch nochmals wiederholt. Das Phenylisocyanat-*d*-phenylalanin dreht in alkalischer Lösung nach links. Es ist also hier zu setzen $[\alpha]_D^{20°} = -61,3°$. (*S. 136.*)

Die Menge des Phenylalanins ist gering. Bei Anwendung von 500 g Caseïn wurden aus der Fraktion 130—160° 6 g Rohprodukt gewonnen. Da etwas Ester beim Waschen mit Wasser verloren geht und da eine andere, allerdings kleinere Menge sich in der niedrigeren Fraktion findet, da ferner die Estermethode selbst beim reinen Präparat ungefähr 55% Verluste bringt, so darf man annehmen, daß die Menge des Phenylalanins nicht weniger als 2½% des Caseïns beträgt. Trotzdem würde seine Isolierung ohne die Estermethode wohl recht schwierig sein, da für die Trennung von dem Leucin kein brauchbares Verfahren bekannt ist. Tatsächlich ist E. Schulze, wohl der beste Kenner des Phenylalanins, welcher es zuerst unter den Spaltungsprodukten der pflanzlichen Proteïne fand, bei Anwendung von 1 kg Caseïn nicht zum Ziele gelangt, obschon er bei der Oxydation der rohen Aminosäuren mit Bichromat und Schwefelsäure Benzoësäure erhielt und dadurch auf die Vermutung kam, daß Phenylalanin vorhanden sein könnte[1]).

Der Bildung der Benzoësäure soll nach den Angaben von Schulze und Barbieri[2]) der Geruch nach Benzaldehyd voraufgehen. Ich halte es auch für sehr wahrscheinlich, daß in dem späteren Stadium der Oxydation Benzaldehyd auftritt, aber das Produkt, welches sich zuerst bildet, hat den charakteristischen Geruch des Phenylacetaldehyds, und es lassen sich mit Hilfe desselben noch recht kleine Mengen Phenylalanin nachweisen. So genügt es, 0,02 g in 2—3 ccm 25-prozentiger Schwefelsäure zu lösen, dann ein paar Körnchen Bichromat hinzuzufügen und zu kochen, um sehr deutlich den Geruch des Aldehyds zu erhalten[3]).

Zusammenfassung der Resultate:

1. Die Trennung der Monoaminosäuren durch fraktionierte Destillation ihrer Ester ist den bisher gebräuchlichen Methoden zur Isolierung und Erkennung dieser Säuren sowohl an Leistungsfähigkeit wie an Schnelligkeit der Ausführung weit überlegen. Eine Ausnahme besteht nur für das Tyrosin, welches viel leichter durch direkte Kristallisation gewonnen wird;

---

[1]) Zeitschr. für physiol. Chem. **9**, 120 [1885].

[2]) Journ. für prakt. Chem. **27**, 345 [1883].

[3]) Etwas beständiger sind die fetten Aminosäuren gegen oxydierende Agentien. So wird das Alanin in verdünnter schwefelsaurer Lösung von Chromsäure nur langsam angegriffen. Löst man aber dasselbe in 25-prozentiger Schwefelsäure, fügt einige Körnchen Kaliumpermanganat hinzu und kocht, so tritt nach kurzer Zeit auch der Geruch nach Acetaldehyd auf. Die Bildung von Aldehyden bei der Oxydation von Aminosäuren erfolgt offenbar unter Abspaltung von Kohlensäure und Ammoniak.

2. unter den Spaltungsprodukten des käuflichen Caseïns durch Salzsäure sind außer den schon beobachteten Aminosäuren sicher nachgewiesen: Phenylanalin und eine Aminovaleriansäure von unbekannter Struktur. Sehr wahrscheinlich ist auch die Anwesenheit von Glykocoll gemacht;

3. bei der Hydrolyse des Caseïns durch Salzsäure entstehen erhebliche Mengen von α-Pyrrolidincarbonsäure, die bisher unter den Spaltungsprodukten der Proteïnstoffe noch nicht gefunden war. Ein Teil der Säure ist in der bisher unbekannten aktiven *l*-Form isoliert worden, der andere Teil war racemisiert. Die Säure scheint ein primäres Spaltungsprodukt des Caseïns zu sein und entsteht auch aus anderen Proteïnstoffen, z. B. dem Blutfibrin;

4. die mit der Estermethode isolierten Aminosäuren sind teilweise racemisiert, speziell wurde dies nachgewiesen für Leucin, Phenylalanin und Asparaginsäure. Für die Isolierung der einzelnen Säuren durch Kristallisation ist es deshalb ratsam, die ganze Menge durch Erhitzen mit Barytwasser unter Druck vorher zu racemisieren;

5. für die Identifizierung der Aminosäuren leistet die Untersuchung der Phenylisocyanatverbindung und ihres Anhydrids manchmal sehr gute Dienste;

6. die schon von E. Schulze bei Gemischen beobachtete Veränderung in der Löslichkeit der aminosauren Kupfersalze hat sich an neuen auffallenden Beispielen wieder gezeigt. So wird das Kupfersalz der Aminovaleriansäure bei Gegenwart von *l*-Pyrrolidincarbonsäure in absolutem Alkohol löslich. Ferner bildet Leucinkupfer mit dem aminovaleriansauren Kupfer in Wasser leicht lösliche große Kristalle, welche die Zusammensetzung einer molekularen Verbindung zeigen;

7. der Ester des Phenylalanins läßt sich von den Estern der Glutamin- und Asparaginsäure, welche ungefähr den gleichen Siedepunkt haben, durch Behandlung mit Wasser leicht trennen.

Beim Kochen von Phenylalanin mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat tritt der Geruch von Phenylacetaldehyd auf, und diese Reaktion bildet eine ebenso scharfe wie bequeme Methode zur Auffindung des Phenylalanins.

Die vorstehenden Versuche waren zum Teil außergewöhnlich mühsam und langwierig. Um so mehr fühle ich mich meinem Assistenten, Herrn Dr. Otto Wolfes, für die dabei geleistete Hilfe zu großem Dank verpflichtet.

---

45. Emil Fischer und Aladar Skita: Über das Fibroïn der Seide.

Zeitschrift für physiologische Chemie **33**, 177 (1901).
(Eingegangen am 5. Juli.)

Die Seide läßt sich bekanntlich durch Behandeln mit Seife, Alkali und selbst durch heißes Wasser in 2 Bestandteile scheiden, welche die Namen Fibroïn und Sericin[1]) (Seidenleim) führen. Das erstere ist unlöslich und überwiegt an Menge; es ist daher am häufigsten Gegenstand der Untersuchung gewesen[2]).

Um Aufschluß über seine Konstitution zu erlangen, hat man, wie allgemein bei Proteïnstoffen, die Hydrolyse durch Säuren benützt.

Hierbei beobachteten Hinterberger und Waltenberger[3])[4]) das Tyrosin und wollten auch das Leucin gefunden haben; zu denselben Resultaten gelangten auch Staedeler[5]) und Cramer[6]). Letzterer fand außerdem noch Glykocoll. An Stelle von Säuren hat Schützenberger[7]) Barytwasser — bei höherer Temperatur unter Druck — für die Hydrolyse der Proteïnstoffe verwendet. Bei der Übertragung dieses Verfahrens auf das Seidenfibroïn, das er in Gemeinschaft mit Burgeois bearbeitete, fand er neben Ammoniak, Oxalsäure, Kohlensäure und Essigsäure ein Gemisch von Aminosäuren, das folgende Zusammensetzung haben soll:

Tyrosin	10%
Gemisch äquivalenter Teile von Glykocoll und Alanin	60%
Aminobuttersäure	10%
Ungesättigte Säure $C_4H_7NO_2$	20%.

---

[1]) Der Name Fibroïn wurde von Mulder, Pogg. Ann. d. Chem. **37**, 611 [1836], der Name Sericin von Cramer, Journ. f. prakt. Chem. **96**, 76 [1865] in die Literatur eingeführt.

[2]) Die ältere Literatur ist in der Abhandlung von Cramer, Journ. f. prakt. Chem. **96**, 76 [1865] aufgeführt.

[3]) Jahresber. f. Chem., 1853, 615.

[4]) Wien. Akad. Ber. **9**, 450.

[5]) Ann. d. Chem. **111**, 12 [1859].

[6]) Journ. f. prakt. Chem. **96**, 76 [1865].

[7]) C. R., **81**, 1191 [1875].

In dieser kurzen Abhandlung ist die ältere Literatur nicht erwähnt, und ebenso fehlen Belege für die Resultate gänzlich. Da außerdem das von Schützenberger angewandte Verfahren nicht einwandfrei ist, da Baryt bei hoher Temperatur sekundäre Zersetzungen bewirken kann, so sind seine Angaben über das Vorhandensein von Aminobuttersäure und Alanin ebenso zweifelhaft, wie die früheren über die Entstehung von Leucin; was die ungesättigte Aminosäure betrifft, so steht ihre Existenz völlig in der Luft.

Ungleich zuverlässiger sind die Arbeiten von Weyl[1]), der die Hydrolyse wieder mit Säuren bewerkstelligte und zuerst unter den Spaltungsprodukten neben Tyrosin und Glykocoll eine Aminoproprionsäure, wahrscheinlich α-Alanin, mit Sicherheit nachwies, indem er sie in reinem Zustande isolierte. Leucin konnte er nicht finden.

Zuletzt hat sich Wetzel[2]) mit demselben Gegenstande beschäftigt, aber unter den Hydrolysierungsprodukten nur die Diaminosäuren gesucht. Leider sind seine Angaben über das Vorkommen von Histidin recht lückenhaft und um so weniger brauchbar, als es zweifelhaft ist, ob das von ihm dargestellte Fibroïn rein war.

Wie aus obiger Zusammenstellung hervorgeht, sind bisher als Spaltungsprodukte des Seidenfibroïns nur Tyrosin, eine Aminopropionsäure und Glykocoll erkannt. Bei den beiden ersten ist es zudem noch unbestimmt, ob sie als aktive oder racemische Form auftreten. Der Wunsch, diese Lücke auszufüllen, war für uns die erste Veranlassung, das Studium des Fibroïns wieder aufzunehmen.

Es gelang uns auch mit leichter Mühe der Nachweis, daß das Tyrosin der Seide mit dem *l*-Tyrosin des Caseïns und anderer Proteïne identisch ist.

Ebenso wurde die Aminopropionsäure als optisch-aktiv erkannt. Sie ist mit dem *d*-Alanin, das vor einiger Zeit aus der racemischen Verbindung dargestellt wurde[3]), identisch.

Andererseits kamen wir bald zu der Überzeugung, daß es mit den alten Methoden nicht möglich ist, alle hier vorhandenen Aminosäuren zu isolieren.

Wir haben deshalb auf das Fibroïn das neue Verfahren, die Aminosäuren mit Hilfe ihrer Ester zu trennen, angewandt. Dabei ergab sich, daß die Zusammensetzung des Fibroïns komplizierter ist, als man bisher annahm. Außer *l*-Tyrosin, *d*-Alanin und Glykocoll haben wir *l*-Phenylalanin und *l*-Leucin mit Sicherheit nachweisen können,

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1529 und 1407 [1888].

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 535 [1899].

[3]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2451 [1899]. (*S. 87.*)

sowie die Anwesenheit von mehreren anderen Aminosäuren sehr wahrscheinlich gemacht.

Darstellung des Fibroïns.

Für die Darstellung des Fibroïns haben wir das von Cramer[1]) zuerst angegebene Verfahren, Einwirkung von Wasser bei höherer Temperatur unter Druck, am geeignetsten gefunden.

Bei richtiger Anwendung desselben wird der Seidenleim vollständig gelöst, während sämtliches Fibroïn unverändert bleibt.

Bei der Behandlung mit Alkali oder Säuren ist das aber nicht der Fall, weil diese auch auf das Fibroïn lösend einwirken. Ja selbst mit Wasser muß man vorsichtig sein, weil die geringsten Mengen Alkali das Resultat stören. So erreicht man bei Anwendung von Glasgefäßen niemals konstante Resultate, wie folgender Versuch zeigt: 10 g technisch degommierter Seide verloren beim Kochen mit 5 Liter Wasser im Glaskolben mit Rückflußkühler in den ersten 48 Stunden 22%, in den folgenden 48 Stunden an eine neue Menge Wasser 17%, dann 16% usw., so daß nach 300-stündigem Kochen 70% der Seide in Lösung gegangen waren. Der Rückstand hatte Glanz und Festigkeit verloren und glich Stücken zerkochten Filterpapieres.

Diese Gefahr wird aber vermieden bei Anwendung von Porzellan- oder verzinnten Kupfergefäßen. Zur Darstellung des Fibroïns haben wir deshalb die Seide in einem 5 Liter fassenden Porzellantopf von der Form eines Becherglases in einem Autoklaven mit der 25-fachen Menge Wasser 3 Stunden auf 117—120° erhitzt. Diese Operation wurde 1—2mal wiederholt, bis keine Gewichtsabnahme mehr stattfand. Am bequemsten ist die Anwendung der technisch degommierten Seide, bei der ein zweimaliges Kochen mit Wasser vollauf genügt. Bei einer quantitativen Probe stellten wir fest, daß hier 5,4% der trockenen Seide von dem Wasser gelöst wurde. Ein Versuch mit 162 g gelber, lombardischer Rohseide, deren Trockengewicht bei 120° festgestellt war, ergab, daß nach dreimaligem Auskochen aller Seidenleim entfernt war. Die Menge des rückständigen Fibroïns betrug 111 g, entsprach also 68,5%[2]) der angewandten Rohseide.

Dieses, aus gelber Rohseide dargestellte Fibroïn hat im Vergleiche zu dem aus technisch degommierter Seide hergestellten noch einen schwachen Stich ins Gelbliche. Beide Sorten besitzen noch die Festig-

---

[1]) Journ. f. prakt. Chem. **96**, 76 [1865].

[2]) Diese Angabe nähert sich der von Cramer (66%), Journ. f. prakt. Chem. **96**, 76 [1865]; die Angaben von Mulder (53%), Pogg. Ann. d. Chem. **37**, 611 und Berz. Jahresb. **17**, 380, und Staedeler (42—50%), Ann. d. Chem. **111**, 12 [1859], beruhen auf der unvollkommenen Gewinnungsweise des Fibroïns.

keit des Seidenfadens, aber nicht mehr den vollen Glanz und die Weichheit der Seide; auch ist die Hygroskopizität vermindert. Wesentlich andere Eigenschaften hat das Fibroïn, das nach dem Verfahren von Staedeler[1]) mit Natronlauge gewonnen wird. Es bildet eine brüchige und zerreibliche Masse, wie schon Staedeler[2]) und Weyl[3]) angeben. Dies rührt von einer teilweisen chemischen Veränderung des Fibroïns selbst her, das gegen Alkalien nichts weniger als beständig ist.

Das zu den nachfolgenden Versuchen verwandte Fibroïn ist ausschließlich aus lombardischer Seide und zwar meist aus der technisch degommierten Sorte dargestellt worden.

Hydrolyse des Fibroïns durch Schwefelsäure.

Handelt es sich um die Gewinnung von Tyrosin, so folgt man am besten den älteren Vorschriften[4]) für die Spaltung des Fibroïns mit verdünnter Schwefelsäure. Wir haben dementsprechend bei einem Versuch 250 g reines Fibroïn mit einem Gemisch von 500 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 2500 ccm Wasser 18 Stunden gekocht. Die braungelb gefärbte Flüssigkeit zeigte keine Biuretreaktion mehr. Die ausgeschiedene dunkle, zu Klümpchen geballte Masse, welche größtenteils aus fettsäure-ähnlichen Stoffen bestand, wurde nach dem Erkalten abfiltriert; ihre Menge betrug 2,5 g, also 1% des angewandten Fibroïns. Nun wurde das Filtrat in der Wärme mit ungefähr 2 kg Barythydrat, das in möglichst wenig heißem Wasser gelöst war, neutralisiert, der überschüssige Baryt mit Kohlensäure gefällt und die neutrale Flüssigkeit heiß auf einer großen Nutsche abgesogen.

Um das schwerlösliche Tyrosin ganz zu gewinnen, ist es ratsam, den Barytniederschlag mit Wasser nochmals auszukochen. Das Filtrat wird verdampft, bis schon in der Wärme eine reichliche Kristallisation eintritt. Nach dem Erkalten wird filtriert und die Kristallmasse, welche 40—50 g beträgt, mit wenig heißem Wasser ausgekocht, um das beigemengte Alanin zu entfernen. Den Rückstand löst man dann in ungefähr 3,5 Liter siedendem Wasser, kocht mit Tierkohle und läßt das klare Filtrat kristallisieren. Die Ausbeute an reinem Tyrosin betrug 25 g, mithin 10% der angewandten Fibroïnmenge, während Weyl nur 5,2% angibt[5]). Die Angaben Schützenbergers gestatten keinen

---

[1]) Ann. d. Chem. **111**, 12.
[2]) Ann. d. Chem. **111**, 12.
[3]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1529 [1888].
[4]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1529 [1888].
[5]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1529. Bei der Zahl ist übrigens ein Rechen- oder Druckfehler untergelaufen. Berechnet man sie nach den anderen Angaben über die Ausbeute von Glykocoll und Alanin, so resultiert 7,5%.

Vergleich, da sie sich bloß auf das Verhältnis des Tyrosins zu der Menge der isolierten Aminosäuren beziehen. Für die optische Untersuchung diente die Lösung des Tyrosins in 21-prozentiger Salzsäure. Eine Lösung von 4,2% und dem spezifischen Gewicht 1,118 drehte bei 20⁰ im 2-Dezimeterrohre 0,77 nach links. Mithin ist:

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -8,20.$$

Das Tyrosin ist demnach identisch mit der aktiven Form, die man bisher aus den anderen Proteïnstoffen gewonnen hat.

Aus den Mutterlaugen des Tyrosins wurden durch wiederholtes Eindampfen und systematisches Umkristallisieren Alanin und Glykocoll in reinem Zustand isoliert.

Die Analyse des Alanins gab folgendes Resultat:

0,1894 g Substanz: 0,2809 g CO_2, 0,1348 g H_2O.

$C_3H_7NO_2$. Ber. C 40,45%, H 7,86%.

Gef. „ 40,45%, „ 7,91%.

Das Produkt wurde von Weyl, der sich mit der Prüfung der freien Aminosäure begnügte, für optisch-inaktiv gehalten. In Wirklichkeit ist es aber aktiv, wie uns die Untersuchung des Hydrochlorats zeigte. Seine wässerige Lösung von 8,58% und dem spezifischen Gewichte 1,02 drehte bei 20^0 das Natriumlicht im 1-Dezimeterrohre $0,82^0$ nach rechts. Daher war

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +9,37.$$

Dieser Wert ist fast der gleiche wie der für reines, salzsaures *d*-Alanin früher[1]) gefundene.

Wie schon erwähnt, haben die Schwierigkeiten, auf welche wir bei der Trennung der Aminosäuren durch Kristallisation stießen, uns veranlaßt, für diesen Zweck die fraktionierte Destillation ihrer Ester zu benützen.

Hydrolyse des Fibroïns durch Salzsäure und Trennung der Aminosäuren durch ihre Ester.

Glykocoll. Will man auf die Isolierung des Tyrosins verzichten, so ist es am besten, die Spaltung des Fibroïns mit Salzsäure durchzuführen und nach dem Verdampfen der wässerigen Säure den Rückstand sofort zu verestern.

250 g Fibroïn werden mit 1 Liter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 übergossen. Nach kurzem Schütteln entsteht eine braun-

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 32, 2451 [1899]. Das synthetische Alanin drehte +9,55. Später gefunden +10,3. (*S. 561.*)

gelbe Lösung, die am Rückflußkühler 5 Stunden gekocht wird. Auf der dunkelbraunen Flüssigkeit schwimmt dann eine kleine Menge Fettsäure, die nach dem Erkalten abfiltriert wird. Die Mutterlauge wird am besten unter stark vermindertem Druck bis zum dicken Sirup eingedampft. Diesen übergießt man sofort mit $1^1/_2$ Liter absolutem Alkohol und leitet einen lebhaften Strom gasförmiger Salzsäure bis zur Sättigung ein, ohne die Lösung zu kühlen. Man kocht schließlich noch 1 Stunde auf dem Wasserbade, wobei ein Teil der Salzsäure entweicht. Das Gemisch der salzsauren Salze geht meistens schon beim Einleiten der Salzsäure in Lösung, jedenfalls aber erfolgt diese vollständig beim Erwärmen auf dem Wasserbade, das den Zweck hat, die Veresterung völlig zu Ende zu führen. Nach dem Abkühlen bringt man die alkoholische Lösung in eine Kältemischung, impft mit einem Kristall von salzsaurem Glykocollester und läßt 48 Stunden im Eisschrank stehen. Dann hat sich in der Regel der allergrößte Teil des salzsauren Glykocollesters als Kristallbrei abgeschieden. Er wird über Glaswolle abgesogen, mit wenig kaltem absoluten Alkohol und Äther gewaschen und schließlich im Vakuum über Natronkalk getrocknet. Das so erhaltene Präparat ist nur wenig mehr gefärbt.

Da bei der Veresterung ziemlich viel Wasser entsteht, welches der Reaktion entgegenwirkt, so ist es vorteilhaft, die alkoholische Mutterlauge unter stark vermindertem Druck einzudampfen, den Rückstand wieder in 1 Liter absolutem Alkohol zu lösen und neuerdings mit gasförmiger Salzsäure in der zuvor beschriebenen Weise zu behandeln. Bleibt die Flüssigkeit jetzt bei niederer Temperatur 12 Stunden stehen, so pflegt, namentlich beim Einimpfen eines Kristalles, noch eine neue, aber meist geringe Kristallisation von salzsaurem Glykocollester stattzufinden. Die Gesamtmenge desselben betrug im Durchschnitt 67% des Fibroïns. Dies ergibt für freies Glykocoll 36%, während Weyl[1]) durch Kristallisation nur 7,5% isolieren konnte. Einmaliges Umkristallisieren des Hydrochlorates aus der 7-fachen Menge heißem absoluten Alkohol genügt, um ein ganz reines Präparat vom Schmelzpunkt 144° zu erhalten. Wir haben uns noch überzeugt, daß der aus dem Hydrochlorat isolierte freie Ester bei 8 mm Druck konstant bei 45° destillierte und mithin frei von Homologen war.

Die salzsaure, alkoholische Mutterlauge, welche die Ester der übrigen Aminosäuren enthielt, wird gerade so verarbeitet, wie es in der vorhergehenden Arbeit über das Caseïn beschrieben ist; schließlich wurde das von Äther befreite und mit Natriumsulfat getrocknete Gemisch der Ester bei 8 mm Druck fraktioniert. Nach 2—3maliger

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1529 [1888].

Wiederholung der Destillation unter den gleichen Bedingungen wurden folgende Fraktionen erhalten:

1.	Fraktion	43—53⁰	70 g
2.	„	53—75⁰	13 „
3.	„	75—90⁰	6 „
4.	„	90—140⁰	3 „
5.	„	140—160⁰	3 „
6.	„	über 160⁰	0,5 „
			95,5 g

Die erste Fraktion (43—53⁰) enthielt neben wenig Alkohol fast ausschließlich Alaninester, denn das Glykocoll ist durch die vorhergehende Behandlung so gut wie vollständig entfernt.

d-Alanin. Zur Gewinnung des reinen Alanins wird der Ester — am besten sofort — mit der 10-fachen Menge Wasser 4—5 Stunden am Rückflußkühler gekocht, bis die alkalische Reaktion verschwunden ist, worauf die Lösung eingedampft wird. Die Ausbeute an Alanin betrug 19% des angewandten Fibroïns. Zur vollständigen Reinigung löst man das Präparat in der 6-fachen Menge Wasser, entfärbt, wenn nötig, durch Kochen mit Tierkohle und versetzt die heiße Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Alkohol. Beim Erkalten scheidet sich das reine *d*-Alanin in langen, farblosen Nadeln ab, welche unter Zersetzung bei 297⁰ schmelzen.

0,1963 g gaben 0,2910 g CO_2 und 0,1403 g H_2O.

$C_3H_7NO_2$. Ber. C 40,45%, H 7,86%.

Gef. „ 40,44%, „ 7,95%.

Das über Phosphorpentoxyd im Vakuum getrocknete Chlorhydrat lieferte die nachstehende optische Bestimmung: 0,6712 g Substanz drehte in wässeriger 9,07-prozentiger Lösung vom spezifischen Gewicht 1,015 das Natriumlicht im 1-Dezimeterrohre 0,85⁰ nach rechts.

Demnach ist

$$[\alpha]_D^{20^0} = +9,23.$$

Da aus der nachfolgenden Fraktion der Ester noch 2% Alanin gewonnen werden konnten, so betrug seine Gesamtmenge 21% des Fibroïns, während Weyl[1]) nur 15% isolieren konnte.

Man sieht, wie auch hier die Estermethode dem alten Verfahren überlegen ist. Da das *d*-Alanin bisher nur auf mühsamem Wege durch Spaltung des Racemkörpers gewonnen werden konnte, so ist die eben beschriebene Darstellung aus Seide — trotz des hohen Preises der

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **21**, 1529 [1888].

letzteren — bequemer und billiger. Man wird aber dann auf die Isolierung des Fibroïns verzichten und die käufliche, degommierte Seide, in welcher wir, wie erwähnt, bloß 5% Seidenleim fanden, direkt verwenden.

Die zweite Fraktion (53—75°) enthält ebenfalls noch eine beträchtliche Menge Alanin und außerdem homologe Aminosäuren, von denen aber keine isoliert werden konnte.

Die Ester wurden ebenfalls mit der 10-fachen Menge Wasser verseift und die freien Aminosäuren aus der eingeengten, wässerigen Lösung mit Alkohol gefällt. Durch wiederholte Kristallisation gelang es, 5 g reines Alanin zu gewinnen.

0,1270 g Substanz gaben 0,1886 g CO_2 und 0,0909 g H_2O.

$C_3H_7NO_2$. Ber. C 40,45%, H 7,86%.
Gef. „ 40,50%, „ 7,93%.

Die isolierten 5 g entsprechen 2% des angewandten Fibroïns. Ein Versuch, die kohlenstoffreicheren Aminosäuren dieser Fraktion mit Hilfe ihrer Kupfersalze abzutrennen, mißlang.

Die dritte Fraktion (75—90°) enthält neben anderen Produkten eine relativ erhebliche Menge des Esters des gewöhnlichen Leucins.

l-Leucin. Nachdem die Aminosäuren durch Kochen mit Wasser aus den Estern regeneriert waren, diente für die Isolierung des Leucins das schwer lösliche Kupfersalz. Für seine Bereitung wurden 4 g der rohen Aminosäuren in 400 ccm Wasser gelöst, $1^1/_2$ Stunden mit überschüssigem gefällten Kupferoxyd gekocht, das Filtrat verdampft und der Rückstand mit 100 ccm Wasser ausgekocht. Es verblieb ein Rest von 1,4 g schwer löslichem Kupfersalz, das hauptsächlich aus der Leucinverbindung bestand. Ein Teil derselben wurde aus siedendem Wasser umkristallisiert und zeigte nach dem Trocknen bei 108° die Zusammensetzung des Leucinkupfers.

0,1872 g Substanz lieferten 0,0460 g CuO.

$C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$. Ber. Cu 19,60%.
Gef. „ 19,62%.

Ein anderer Teil des Kupfersalzes wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die Aminosäure zweimal aus der heißen, wässerigen Lösung mit Alkohol gefällt. Die so erhaltenen glänzenden Blättchen zeigten die Zusammensetzung des Leucins.

0,0849 g Substanz ergaben 0,1708 g CO_2 und 0,0765 g H_2O.
0,2222 g Substanz lieferte bei 19° und 768 mm 20 ccm N.

$C_6H_{13}O_2N$. Ber. C 54,96%, H 9,92%, N 10,68%.
Gef. „ 54,87%, „ 10,01%, „ 10,52%.

Das Produkt drehte in 20-prozentiger salzsaurer Lösung nach rechts, wie es für das bisher in den Proteïnstoffen gefundene *l*-Leucin bekannt ist. Aus der Stärke der Drehung ergab sich, daß der aktiven Aminosäure der Racemkörper beigemengt ist, dessen Menge in verschiedenen Kristallisationen variierte. Da durch diese Komplikation die Identifizierung des Leucins durch den Schmelzpunkt seiner Derivate außerordentlich erschwert wurde, so haben wir die gesamten aus dieser Fraktion erhaltenen Aminosäuren durch 30-stündiges Erhitzen mit überschüssigem Barytwasser auf 170—180° völlig racemisiert.

Dann wurde das Leucin mit Hilfe seines Kupfersalzes abgeschieden, durch Schwefelwasserstoff regeneriert und in der bekannten Weise die Phenylisocyanatverbindung sowie deren Anhydrid dargestellt. Das erste Präparat zeigte den Schmelzpunkt 165° (korr.), welcher auch früher für die Phenylcyanatleucinverbindung gefunden wurde[1]). Für das zugehörige Hydantoïn wurde der Schmelzpunkt 125° (korr.) beobachtet. Da Mouneyrat, welcher diese Verbindung zuerst darstellte[2]), den Schmelzpunkt nicht erwähnt, so haben wir denselben für das synthetische Produkt nachträglich festgestellt und ebenfalls 125° gefunden. Die Analyse des Hydantoïns gab folgende Zahlen:

0,1003 g Substanz lieferten 0,2465 g CO_2 und 0,0611 g H_2O.

$C_{13}H_{16}O_2N_2$. Ber. C 67,24%, H 6,89%.
Gef. „ 66,94%, „ 6,77%.

Nach alledem kann kein Zweifel sein, daß der aus dem Seidenfibroïn erhaltene Körper identisch ist mit dem gewöhnlichen *l*-Leucin (α-Aminoisobutyl-Essigsäure). Seine Menge ist aber recht gering; wir schätzen sie auf 1—1½% des Fibroïns.

Eine so kleine Quantität des Leucins nach der alten Methode in dem Gemisch der Aminosäuren, welche aus dem Fibroïn entstehen, zu erkennen, können wir ohne Bedenken für unmöglich erklären. Was Hinterberger und Waltenberger, die nicht einmal das Glykocoll gefunden haben, für Leucin erklären, ist nichts anderes als das rohe Gemisch der Aminosäuren gewesen.

Neben dem Leucin sind in derselben Fraktion noch leichter lösliche Aminosäuren, unter denen sich wahrscheinlich eine Aminovaleriansäure befindet. Dagegen haben wir für das Vorkommen von Aminobuttersäure, welche Schützenberger unter den Spaltungsprodukten des Fibroïns gefunden haben will, keine Andeutung bemerkt, und wir halten es für gänzlich ausgeschlossen, daß Schützenberger

---

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2381 [1900]. (*S. 129.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2395. (*S. 171.*)

bei seiner Arbeitsmethode diese Verbindung in reinem Zustand gewinnen konnte.

Die vierte und fünfte Fraktion (90—140° und 140—160°) sind zum Teil in Wasser löslich, enthalten jedoch außerdem den wasserunlöslichen Ester des Phenylalanins.

l-Phenylalanin. Da seine Menge gering ist, wurden beide Fraktionen in folgender Weise darauf verarbeitet.

Um den wasserunlöslichen Teil abzuscheiden, fügt man zu den Estern die 10-fache Menge kaltes Wasser und filtriert nach tüchtigem Schütteln von dem unlöslichen Öl durch ein gehärtetes, befeuchtetes Filter. Es wird nochmals mit einer kleinen Menge Wasser gewaschen und auf dieselbe Art getrennt. Zum Schluß wurde das Öl zur Verseifung mit überschüssigem 10-prozentigen Barytwasser unter häufigem Umschütteln mehrere Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, von dem unveränderten Öl, das aus anderen Produkten besteht, filtriert, der Baryt mit Kohlensäure gefällt und das wässerige Filtrat verdampft.

Das so erhaltene Produkt, dessen Menge 0,6 g betrug, war Phenylalanin, aber noch keineswegs rein. Es gab beim Kochen mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure den charakteristischen Geruch des Phenylacetaldehyds und lieferte mit Kupferacetat ein in Wasser schwer lösliches Kupfersalz. Da das Phenylalanin durch Kristallisation nicht leicht zu reinigen ist, zogen wir es vor, die kleine Menge in die Verbindung mit Phenylisocyanat zu verwandeln. Zu diesem Zweck wurden in der früher beschriebenen Weise 0,3 g in 3 ccm Normal-Kalilauge gelöst, die filtrierte Flüssigkeit stark abgekühlt und tropfenweise unter kräftigem Schütteln mit 0,3 g Phenylisocyanat versetzt. Nachdem der Geruch des letzteren völlig verschwunden war, wurde mit Tierkohle aufgekocht und das Filtrat nach dem Erkalten mit einem geringen Überschuß verdünnter Schwefelsäure gefällt. Das anfangs ausgeschiedene Öl erstarrte bald kristallinisch. Das Produkt wurde zuerst aus heißem absoluten Alkohol mit Wasser gefällt und dann aus der 250-fachen Menge siedenden Wassers umkristallisiert. Die so erhaltenen weißen Nädelchen schmolzen nach dem Trocknen im Vakuum ebenso wie das bekannte Phenylisocyanat-*d*-phenylalanin[1]) bei 181° (korr.) und gaben folgende Zahlen:

0,0773 g Substanz: 0,1916 g CO_2, 0,0411 g H_2O.

$C_{16}H_{16}O_3N_2$. Ber. C 67,60%, H 5,63%.

Gef. „ 67,63%, „ 5,89%.

In alkalischer Lösung drehte die Substanz nach rechts. Eine approximative Bestimmung mit 0,15 g Substanz in ungefähr $3^1/_2$-pro-

[1]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **33**, 2386 [1900]. (*S. 135.*)

zentiger alkalischer Lösung ergab eine Drehung von 0,42, also eine spezifische Drehung:

$$[\alpha]_D^{20^0} = +11,5.$$

Demnach enthielt das Präparat das Phenylcyanatderivat des *l*-Phenylalanins, aber demselben war eine große Menge des Racemkörpers beigemengt. Aller Wahrscheinlichkeit nach enthält das ursprüngliche Fibroïn nur aktives *l*-Phenylalanin. Aber bei der Hydrolyse, dem Eindampfen der sauren Lösung, der Veresterung usw. kann eine teilweise Racemisierung stattfinden. Die Menge des Phenylalanins ist gering. Wir schätzen sie auf 1—$1^1/_2$% des angewandten Fibroïns.

Nach den vorliegenden Erfahrungen und den Beobachtungen beim Caseïn[1]) darf man erwarten, daß die Proteïnstoffe, welche reich an Tyrosin sind, auch Phenylalanin enthalten.

Die vierte Fraktion besteht, wie zuvor erwähnt, größtenteils aus wasserlöslichen Produkten. Nachdem das Phenylalanin abgeschieden war, wurde die wässerige Lösung mit überschüssigem Baryt verseift und die Mutterlaugen nach der Entfernung des Baryts verdampft. Es bleibt ein Gemisch von Aminosäuren zurück, dessen völlige Reinigung uns noch nicht gelungen ist. Die Analysen deuten jedoch übereinstimmend dahin, daß es sich hier um eine Oxysäure, wahrscheinlich um Serin, handelt.

Die Menge der sechsten Fraktion (über 160⁰) ist gering und sehr schwankend, da bei dieser Temperatur schon sehr erhebliche Zersetzungen des Rückstandes im Siedegefäß stattfinden. Diese Fraktion erstarrt beim Erkalten zum Teil kristallinisch. Das feste Produkt läßt sich durch Auslaugen mit Äther von den flüssigen Stoffen befreien und durch Umkristallisieren aus Alkohol reinigen. Der Körper zeigte in dem Schmelzpunkt (gefunden 300⁰ korr.) sowie in den übrigen Eigenschaften große Ähnlichkeit mit dem sogenannten Phenyllactimid, welches bekanntlich durch längeres Erhitzen des Phenylalaninesters entsteht. Leider reichte die Menge für eine Elementaranalyse nicht aus.

Verwandlung des *d*-Alanins in *d*-Milchsäure.

Beziehungen zwischen der optisch-aktiven Form des Alanins und der Milchsäure waren bisher nicht bekannt. Um diese Lücke auszufüllen, haben wir das *d*-Alanin, von welchem uns durch die vorhergehenden Versuche große Mengen zur Verfügung standen, mit salpetriger Säure zersetzt und die rechtsdrehende Milchsäure, die sogenannte Fleischmilchsäure, erhalten.

[1]) Siehe die vorhergehende Arbeit.

Der Versuch wurde unter ähnlichen Bedingungen ausgeführt, wie A. Strecker[1]) vor 51 Jahren das synthetische Alanin in die inaktive Gärungsmilchsäure verwandelte. Nur haben wir es vorteilhaft gefunden, nicht die aus Salpetersäure und Arsentrioxyd entwickelten roten Gase anzuwenden, sondern die salpetrige Säure aus Salzsäure und Silbernitrit direkt in der Flüssigkeit entstehen zu lassen. Dementsprechend wurden 5 g *d*-Alanin in 50 ccm Wasser gelöst, mit 56,5 ccm Normal-Salzsäure (berechnete Menge) versetzt und auf 0° abgekühlt. Wir fügten dann ungefähr 1/2 g Silbernitrit hinzu und ließen nach starkem Schütteln etwa 1/2 Stunde bei 0° und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen, wobei eine regelmäßige Stickstoffentwickelung stattfindet. In dieser Weise fuhren wir mit dem Zusatz des Nitrites fort, bis im Laufe von 2 Tagen 9 g davon eingetragen waren. Dann wurde die Flüssigkeit, welche kein Silber mehr enthielt, filtriert, unter stark vermindertem Druck auf etwa 10 ccm eingedampft und 8 bis 10mal mit der doppelten Menge Äther ausgeschüttelt. Die beim Verdampfen des Äthers zurückbleibende Säure wurde in das Zinksalz verwandelt. Aus der stark eingeengten, wässerigen Lösung schied sich bei längerem Stehen im Eisschrank eine reichliche Menge kleiner, sternförmig vereinigter Nadeln ab. Das bei 115° getrocknete Salz zeigte den Zinkgehalt des Zinklactates:

0,2412 g Substanz gaben 0,0803 g ZnO.

$C_6O_6H_{10}Zn$. Ber. Zn 26,78%.
Gef. „ 26,72%.

Für die optische Bestimmung diente eine wässerige Lösung, welche 3,84% wasserfreies Salz enthielt und das spezifische Gewicht 1,01 hatte. Dies drehte im 2-Dezimeterrohr bei 20° 0,62° nach links. Daraus berechnet sich

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -8,00.$$

Mithin war das Salz unzweifelhaft ein Derivat der *d*-Milchsäure. Es ist aber möglich, daß ihm eine kleine Menge Racemkörper beigemengt war, da das Drehvermögen des rechtsmilchsauren Zinks nach den Angaben der Literatur[2]) etwas mehr, nämlich −8,6 beträgt.

Es ist gewiß kein Zufall, daß die im Fleisch enthaltene Milchsäure und das aus dem Seidenfibroïn oder Caseïn entstehende Alanin die gleiche Konfiguration besitzen.

---

[1]) Ann. d. Chem. 75, 42.

[2]) Landolt, Das optische Drehungsvermögen, 2. Aufl., S. 170: Für wasserhaltiges *d*-milchsaures Zink ist $[\alpha]_D^{20^\circ} = -7,55$, mithin für wasserfreies $[\alpha]_D^{20^\circ} = -8,6$.

Die Resultate unserer Untersuchungen fassen wir folgendermaßen zusammen:

1. Außer den schon früher nachgewiesenen Körpern Tyrosin, Aminopropionsäure und Glykocoll finden sich in den Spaltungsprodukten des Fibroïns mit Salzsäure noch *l*-Leucin, *l*-Phenylalanin und einige noch nicht näher charakterisierte Aminosäuren vor;

2. die Aminopropionsäure der Seide ist im Gegensatz zu der Annahme älterer Beobachter optisch-aktiv; daraus folgt, daß sie α-Aminopropionsäure sein muß. Sie hat sich identisch mit dem *d*-Alanin erwiesen;

3. das Tyrosin ist die auch sonst in den Proteïnstoffen gefundene *l*-Verbindung;

4. für die Trennung des Glykocolls von den kohlenstoffreicheren Aminosäuren ist die Veresterung und die Kristallisation des salzsauren Glykocolls aus Alkohol bei weitem die beste Methode;

5. das *d*-Alanin entspricht in der Konfiguration der *d*-Milchsäure.

6. aus 100 Teilen Fibroïn wurden gewonnen:

	10	Teile	*l*-Tyrosin,
	21	,,	*d*-Alanin,
	36	,,	Glykocoll,
ungefähr	1—1$^1/_2$	,,	*l*-Leucin,
,,	1—1$^1/_2$	,,	Phenylalanin.

Über die Zusammensetzung des Seidenleims, der im Gegensatz zum Fibroïn reich an Diaminosäuren ist, hoffen wir bald berichten zu können.

46. Emil Fischer: Über die Entstehung von α-Pyrrolidincarbonsäure und Phenylalanin bei der Hydrolyse des Eieralbumins.

Zeitschrift für physiologische Chemie 33, 412 (1901).
(Eingegangen am 8. August.)

Für den Versuch diente das käufliche Präparat aus Eiweiß von Dr. Grübler in Dresden, und die Untersuchungsmethode war genau dieselbe wie beim Caseïn[1]).

250 g Albumin wurden mit 750 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19) bei gewöhnlicher Temperatur übergossen und wiederholt umgeschüttelt. Nach einer Stunde war dasselbe zum Teil mit stark violettroter Farbe gelöst, zum anderen Teil gallertig aufgequollen. Als dann am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt wurde, nahm anfangs die violette Färbung noch zu, schlug später aber in braunschwarz um. Nach sechsstündigem Kochen wurde die Operation unterbrochen und die Flüssigkeit nach längerem Stehen von einer dunklen schmierigen Ausscheidung durch Filtration getrennt. Wie es scheint, rühren diese dunklen Zersetzungspunkte, die beim Caseïn nur in ganz geringer Menge entstehen, von den im Albumin vorhandenen Kohlenhydraten her. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck stark eingeengt und der Rückstand mit Alkohol und Salzsäure verestert. Die Destillation des Estergemisches gab bei 25 mm Druck[2]) folgende Fraktionen:

I.	50— 75°	(35— 60°)	8,8 g
II.	75— 90°	(60— 75°)	10,3 „
III.	90—110°	(75— 95°)	19,5 „
IV.	110—145°	(95—130°)	21,0 „
V.	145—165°	(130—150°)	9,5 „
			69,1 g

Zum Vergleich sind in der Tabelle eingeklammert die Siedepunkte angeführt, welche die gleichen Fraktionen bei 10 mm zeigen würden; selbstverständlich haben diese Zahlen nur eine annähernde Gültigkeit.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 151 [1901]. (*S. 633.*)

[2]) Da die Versuche im hohen Sommer ausgeführt wurden, so war mit der Wasserstrahlpumpe kein niedrigerer Druck zu erreichen.

Da es mir zunächst nur auf den Nachweis von Pyrrolidincarbonsäure und Phenylalanin ankam, so habe ich die Untersuchung auf die Fraktionen III und V beschränkt.

Die Verarbeitung der ersteren war genau dieselbe wie beim Caseïn. Die Menge der aktiven Pyrrolidincarbonsäure, welche mit Hilfe des in Alkohol löslichen Kupfersalzes isoliert war, betrug 1,15 g, und das Präparat zeigte den Schmelzpunkt (205°) sowie alle anderen Eigenschaften der aktiven Säure.

Zur sicheren Identifizierung wurde es noch mit Phenylisocyanat kombiniert und aus dieser Verbindung durch Erhitzen mit Salzsäure das Anhydrid dargestellt. Letzteres zeigte, aus Wasser umkristallisiert, die charakteristischen flachen Nadeln vom Schmelzpunkt 142°.

Die Menge der racemischen α-Pyrrolidincarbonsäure war geringer, denn von dem Kupfersalz wurden nur 0,4 g gewonnen. Bei der Analyse desselben wurde allerdings etwas zu wenig Kristallwasser gefunden:

0,2363 g lufttrockne Substanz verloren bei 110° 0,0230 g H_2O.
0,2133 g wasserfreies Salz gaben 0,0581 g CuO.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$. Ber. H_2O 10,99%. Gef. H_2O 9,79%.
$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$. „ Cu 21,81%. „ Cu 21,75%.

Da aber das Salz sonst ganz die Eigenschaften des *dl*-pyrrolidincarbonsauren Kupfers, z. B. die Löslichkeit, die Form der Kristalle und den starken Geruch nach Pyrrolidin beim Erhitzen oder beim Eindampfen der wässerigen Lösung zeigte, so kann über die Identität kein Zweifel herrschen.

Die Fraktion V der Ester wurde zunächst wie beim Caseïn mit der 7-fachen Menge Wasser durchgeschüttelt und der unlösliche Teil für sich mit Barytwasser bei 100° verseift. Da die Identifizierung des racemischen Phenylalanins sehr viel leichter ist, so habe ich auf die Isolierung der aktiven Aminosäure verzichtet und die filtrierte Barytlösung sofort durch 24-stündiges Erhitzen im Autoklaven auf 160° racemisiert. Die Isolierung des Phenylalanins aus der baryumhaltigen Lösung geschah in bekannter Weise, seine Menge betrug 2,5 g.

Das Produkt gab stark die charakteristische Verwandlung des Phenylalanins in Phenylacetaldehyd beim Kochen mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat. Zur weiteren Identifizierung wurde es einmal aus heißem Wasser umkristallisiert und dann mit Phenylisocyanat gekuppelt. Nach dem Umkristallisieren aus Alkohol zeigte dieses Produkt nicht allein den Zersetzungspunkt (gefunden 178°), sondern auch die Zusammensetzung des Phenylcyanat-Phenylalanins:

0,1963 g Substanz gaben 0,4835 g CO_2 und 0,1010 g H_2O.

$C_{16}H_{16}O_3N_2$. Ber. C 67,60%, H 5,63%.
Gef. „ 67,18%, „ 5,72%.

Die gleiche Übereinstimmung im Schmelzpunkt (gefunden 170 bis 171°) ergab sich bei dem Anhydrid der vorigen Verbindung.

Ähnliche Resultate haben einige Versuche des Herrn Dr. Levene mit der Gelatine ergeben. Die Bildung der α-Pyrrolidincarbonsäure wurde ganz sicher nachgewiesen und diejenige des Phenylalanins sehr wahrscheinlich gemacht. Ausführliche Mitteilung darüber wird bald folgen.

Schützenberger[1]) hat bei seiner ausgedehnten Arbeit über die Zersetzung des Albumins durch Barytwasser ein Produkt isoliert, welches er Tyroleucin nannte und als eine Verbindung von Aminovaleriansäure mit einem Körper $C_9H_{11}NO_2$ glaubte betrachten zu können.

E. Schulze und Barbieri[2]), welche zuerst das Phenylalanin unter den Zersetzungsprodukten der Eiweißstoffe mit Sicherheit erkannten, haben bereits darauf hingewiesen, daß nach dem Befunde von Schützenberger bei der Zersetzung des Albumins mit Barytwasser wahrscheinlich Phenylalanin entstehe. Aber der sichere Beweis dafür würde ohne die Estermethode wohl noch lange nicht geliefert worden sein; denn gerade die Versuche von Schulze[3]) zeigen, welch' außerordentliche Schwierigkeiten die sichere Erkennung des Phenylalanins unter den Spaltungsprodukten der Proteïnstoffe nach den älteren Methoden darbietet.

Was die Pyrrolidincarbonsäure betrifft, so habe ich schon in der ersten Mitteilung hervorgehoben, daß sie wohl zu unterscheiden ist von den schlecht charakterisierten Produkten, welche Schützenberger aus Proteïnstoffen durch Baryt erhielt und Leuceïne genannt hat. Daß die von ihm aufgestellte allgemeine Formel $C_nH_{2n-1}NO_2$ auf die Pyrrolidincarbonsäure zutrifft, ist nur ein Zufall, denn das einfachste Leucein soll nach Schützenberger die Formel $C_4H_7NO_2$ haben und kann demnach keine Carbonsäure des Pyrrolidins sein.

Ich glaube bei dieser Gelegenheit nicht mit meinem Urteil über die Arbeiten Schützenbergers zurückhalten zu sollen. Er hat zweifellos das Verdienst, gezeigt zu haben, daß die Zahl der aus den Proteïnstoffen entstehenden Aminosäuren viel größer ist, als man früher annahm. Aber bei aller Anerkennung der großen Mühe, welche er der Isolierung der Produkte gewidmet hat, kann man sich der Überzeugung nicht verschließen, daß die von ihm verwandte Trennungsmethode sehr unvollkommen gewesen ist. Er hat sich auf fraktionierte Kristalli-

---

[1]) Ann. chim. phys. (5), **16**, 343 [1879].

[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **14**, 1785 [1881].

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 63 [1885].

sation der Aminosäuren aus Wasser und Alkohol beschränkt; daß aber dadurch keine völlige Scheidung dieser Stoffe, welche in hohem Grade zur Bildung von Mischkristallen befähigt sind, zu erreichen ist, wird jeder auf diesem Gebiete bewanderte Beobachter zugeben. Infolgedessen sind die meisten von Schützenberger analysierten Präparate Gemische gewesen, und seine Angaben über die Entstehung der verschiedenen Aminosäuren aus den Proteïnstoffen bedürfen in jedem Einzelfalle der Prüfung.

Auch bei diesen Versuchen habe ich mich der Hilfe des Herrn Dr. O. Wolfes erfreut, wofür ich ihm besten Dank sage.

47. Emil Fischer, P. A. Levene und R. H. Aders: Über die Hydrolyse des Leims.

Zeitschrift für physiologische Chemie 35, 70 (1902).
(Eingegangen am 19. Februar.)

Trotz der zahlreichen Arbeiten über die hydrolytischen Spaltungsprodukte des Leims ist man über deren Natur verhältnismäßig wenig unterrichtet, und die Angaben verschiedener Autoren widersprechen sich zudem in manchen Punkten. Bei der Spaltung durch Säuren ist nachgewiesen die Bildung des Glykocolls und des Leucins[1]). Ferner hat C. Gaehtgens[2]) Asparaginsäure gefunden, deren Menge aber nur auf 0,07% des Leims geschätzt; allerdings ist diese Angabe später von Tatarinoff[3]) wieder bestritten worden, welcher weder Asparaginsäure noch Glutaminsäure finden konnte. Schützenberger und Bourgeois[4]) haben die Gelatine mit Barytwasser bei höherer Temperatur zersetzt und machen über die Natur der Spaltungsprodukte nur die folgenden kurzen Angaben:

Pour l'ichtyocolle, l'osséine et gélatine, on a trouvé comme constituants du mélange amidé:

1. Glycocolle 20 à 25 pour 100;
2. Alanine $C_3H_7AzO_2$;
3. Acide amidobutyrique $C_4H_9AzO_2$;
4. Traces d'acide glutamique;
5. Termes de la série $C_nH_{2n-1}AzO_2$ avec n = 4, 5, 6, plus de 50 pour 100.

Leider fehlen ausführlichere Mitteilungen, wie diese Produkte im Einzelfalle erkannt und ihre Menge bestimmt wurde. Auffallend ist, daß in der Liste der Aminosäuren das Leucin gänzlich fehlt. Wie unvollkommen die von Schützenberger im allgemeinen angewandten Methoden zur Erkennung der einzelnen Spaltungsprodukte der Proteïnstoffe gewesen sind, wurde schon bei einer früheren Gelegenheit hervor-

---

[1]) Braconnot, ferner Nencki, Journ. f. prakt. Chem. 15, 395.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 299.
[3]) Jahresber. 1879, 880.
[4]) Compt. rend. 82, 263.

gehoben[1]). Quantitative Angaben werden von den meisten Beobachtern nur bezüglich des Glykocolls gemacht, aber sie schwanken erheblich. Im Gegensatze zu Schützenberger, der 20—25% des Basengemenges angibt, konnte Charles S. Fischer[2]) durch Überführung in Hippursäure nur 4% Glykocoll gewinnen, während Gonnermann[3]) eine Ausbeute von 8,5% feststellte und wir später zeigen werden, daß man mit Hilfe der hier besonders exakten Estermethode 16,5% der trockenen Gelatine isolieren kann.

Von Diaminosäuren wurden gefunden: Arginin[4]), Histidin und Lysin[5]).

Daß die Gelatine auch eine aromatische Gruppe enthält, ist durch die Beobachtungen von Schlieper und Guckelberger, welche bei der Oxydation Benzoësäure erhielten, von Nencki, Selitrenny, Schulze und in neuester Zeit von K. Spiro[6]) sicher festgestellt, und es sprachen manche Gründe für die Annahme, daß sie in Form von Phenylalanin vorhanden sei. Der definitive Beweis dafür war aber noch zu erbringen.

Angesichts dieser mancherlei Unsicherheiten und Widersprüche haben wir es für nützlich gehalten, die Spaltungsprodukte der Gelatine durch Salzsäure mit Hilfe der neuen, kürzlich beschriebenen Methode, welche auf der fraktionierten Destillation der Aminoester beruht, zu prüfen, und wir haben damit sicher nachweisen können: Glykocoll, Alanin, Leucin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und α-Pyrrolidincarbonsäure[7]).

Das Verfahren war im wesentlichen das gleiche wie beim Caseïn, nur bezüglich der Isolierung des Phenylalanins, dessen Menge hier etwas kleiner ist, wurde noch ein anderer, gewiß in manchen Fällen brauchbarer Weg eingeschlagen.

Zersetzung der Gelatine durch Salzsäure und Veresterung der Aminosäuren.

1 kg beste käufliche Gelatine, welche für bakteriologische Zwecke dient und welche 15,2% Wasser bei 105° verlor, wurde mit 3 L Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,19) übergossen und bei gewöhnlicher

---

[1]) E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 415 [1901]. (*S. 669.*)

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 164.

[3]) Pflügers Archiv **59**, 42.

[4]) Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**, 161.

[5]) Kossel u. Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 203.

[6]) Beitr. z. chem. Physiologie u. Pathologie **1**, 347 [1901].

[7]) Eine kurze Notiz über die Versuche findet sich schon in Zeitschr. f. physiol Chem. **33**, 414. (*S. 669.*)

Temperatur häufig umgeschüttelt. Sie löste sich in 1—2 Stunden mit hellbrauner Farbe. Die Flüssigkeit wurde jetzt 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, wobei die Farbe in dunkelbraun überging, dann unter vermindertem Druck zum dicken Sirup eingedampft, mit 3 L absolutem Alkohol unter Erwärmen gelöst, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und zum Schluß noch 1/2 Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Die abgekühlte Flüssigkeit blieb nach Eintragen eines Kristalles von salzsaurem Glykocollester 48 Stunden im Eisschrank stehen, wobei eine reichliche Kristallisation erfolgte. Die Menge des ausgeschiedenen salzsauren Esters schwankt, sie betrug im Maximum 260 g, gewöhnlich aber nur 100—150 g, weil die alkoholische Lösung meist noch ziemlich viel Wasser enthält. Um dies zu entfernen, wird die alkoholische Mutterlauge wieder im Vakuum zum Sirup eingedampft, mit 3 L Alkohol aufgenommen und von neuem in der gleichen Art mit Salzsäuregas behandelt. Die abgekühlte Flüssigkeit gibt jetzt in der Regel eine zweite Kristallisation. Eventuell muß die gleiche Operation nochmals wiederholt werden. Die Gesamtausbeute betrug 260 g salzsauren Glykocollester oder 140 g Glykocoll. Die Menge von Glykocoll, welche unter diesen Umständen in der alkoholischen Lösung bleibt, ist recht gering. Dadurch wird die spätere Isolierung des Alanins wesentlich erleichtert.

Die weitere Verarbeitung der alkoholischen Mutterlaugen und die Fraktionierung der Aminoester geschah genau so, wie es früher beim Caseïn[1]) beschrieben wurde.

Bei zweimaliger Destillation unter einem Druck von 8—10 mm wurden folgende Fraktionen erhalten:

I.	40— 55°	44,0 g
II.	55— 80°	104,0 ,,
III.	80—100°	36,5 ,,
IV.	100—130°	28,5 ,,
V.	130—160°	20,0 ,,
		233,0 g

Der dunkelbraune Rückstand mit grünlicher Fluoreszenz wog 125 g, war in der Hitze flüssig und erstarrte in der Kälte zu einer amorphen Masse.

Fraktion 40—55°.

Sie enthält den wesentlichsten Teil des Alanins neben etwas Glykocoll und höheren Aminosäuren. Der Ester wurde mit der 5-fachen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 151 [1901]. (*S. 633.*)

Menge Wasser am Rückflußkühler gekocht, bis die alkalische Reaktion verschwunden war, was nach etwa 7 Stunden eintrat. Die Aminosäuren wurden dann durch Eindampfen der Lösung und Kristallisation bei gewöhnlicher Temperatur in 2 Fraktionen zerlegt, deren Gewicht 10 g und 15 g betrug.

Die erste Fraktion war wesentlich Alanin, sie hatte den Schmelzpunkt 270°. Durch systematisches Umkristallisieren wurden daraus 7 g vom Schmelzpunkt 294—295° gewonnen. Die Analyse ergab:

0,2038 g Substanz: 0,3040 g CO_2, 0,1488 g H_2O.

$C_3H_7O_2N$. Ber. C 40,45%, H 7,87%.
Gef. „ 40,68%, „ 8,11%.

Für die optische Untersuchung diente das salzsaure Salz, welches in der früher beschriebenen Weise[1]) bereitet wurde.

Gefunden $[\alpha]_D^{20} = +8,9°$, während für das reine aktive salzsaure Alanin der Wert +10,3° gilt. Es scheint mithin, daß das Präparat eine kleine Menge Racemkörper enthielt.

Zur weiteren Identifizierung wurde das Alanin durch 24-stündiges Erhitzen mit der 20-fachen Menge Wasser und der 3-fachen Menge Barythydrat auf 170—180° völlig racemisiert und dann durch Behandlung mit Bicarbonat und Benzoylchlorid[2]) in das Benzoylderivat verwandelt. Das Präparat gab folgende Zahlen:

0,1922 g Substanz: 0,4380 g CO_2, 0,0990 g H_2O.

$C_{10}H_{11}NO_3$. Ber. C 62,17%, H 5,70%.
Gef. „ 62,15%, „ 5,72%.

Die zweite Fraktion enthielt noch Glykocoll, welches nach der Veresterung wiederum als salzsaures Salz abgeschieden wurde. Die Menge des Hydrochlorats betrug 6 g. Die aus den Mutterlaugen wieder isolierte Aminosäure enthielt noch viel Alanin, aber verunreinigt durch andere Produkte, die wir nicht näher untersucht haben.

Fraktion 55—80°.

Sie enthält große Mengen von Pyrrolidincarbonsäure, und zwar sowohl die aktive wie die racemische Form, ferner Leucin und außerdem kohlenstoffärmere Aminosäuren, vielleicht Aminovaleriansäure und Aminobuttersäure, die aber nicht im reinen Zustande isoliert werden konnten. Das Gemisch der Ester wurde zuerst durch 8-stündiges Kochen mit der 5-fachen Menge Wasser am Rückflußkühler verseift. Die wässerige Lösung gab dann folgende Kristallisationen:

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 32, 2456 [1899]. (*S. 93. 561.*)
[2]) Vgl. E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. 32, 2454. (*S. 90.*)

I.	Beim bloßen Abkühlen	4,0 g
II.	Nach Eindampfen	16,0 ,,
III.	,, ,,	20,5 ,,
IV.	,, ,,	32,5 ,,

Die beiden letzten Fraktionen enthalten die Pyrrolidincarbonsäure. Fraktion III wurde zuerst mit der gleichen Menge Wasser ausgekocht, wobei die Hälfte in Lösung ging, das Filtrat verdampft und der Rückstand mit Fraktion IV vereinigt. Durch Auskochen mit Alkohol wurden aus diesem Produkt 27 g rohe Pyrrolidincarbonsäure erhalten. Zur Reinigung derselben sowie zur Trennung von racemischer und aktiver Form diente das Kupfersalz, welches in der gewöhnlichen Weise bereitet, zur Trockne verdampft und mit Alkohol ausgekocht wurde. Der unlösliche Teil, aus heißem Wasser umkristallisiert, gab die charakteristischen blauen Prismen des racemischen pyrrolidincarbonsauren Kupfers von der Formel $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$.

0,5096 g Substanz: 0,0556 g H_2O bei 120⁰.
0,5240 g ,, 0,1247 g CuO.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$. Ber. H_2O 10,99%, Cu 19,41%.
Gef. ,, 10,91%, ,, 19,01%.

Aus dem in Alkohol löslichen Kupfersalz wurde die aktive Pyrrolidincarbonsäure isoliert. Sie schmolz unter Zersetzung bei 203—204⁰. Zur Identifizierung diente das Anhydrid der Phenylisocyanatverbindung. Es schmolz bei 142⁰ und gab folgende Zahlen:

0,1878 g Substanz: 0,4562 g CO_2, 0,0956 g H_2O.

$C_{12}H_{12}O_2N_2$. Ber. C 66,66%, H 5,55%.
Gef. ,, 66,25%, ,, 5,65%.

Aus den Fraktionen I und II konnte das ziemlich schwer lösliche Leucin durch fraktionierte Kristallisation abgeschieden werden. Das übrige war ein Gemenge von niedrigeren Aminosäuren. Die analytischen Werte für die freien Säuren wie für die Kupfersalze näherten sich in den schwerer löslichen Partien der Aminovaleriansäure und in den leichter löslichen der Aminobuttersäure bzw. dem Alanin. Bevor man aber die Anwesenheit dieser Stoffe definitiv aussprechen kann, halten wir es für nötig, daß sie nicht allein selbst isoliert, sondern auch noch durch verschiedene Derivate charakterisiert werden. Dafür reichte aber die uns zu Gebote stehende Menge nicht aus.

Fraktion 80—100⁰.

Sie enthält Leucin und viel Pyrrolidincarbonsäure. Die Verseifung wurde ebenfalls durch Kochen mit Wasser bewirkt, und die Amino-

säuren zunächst fraktioniert kristallisiert. Die erste Fraktion 5,6 g war Leucin.

0,2034 g Substanz: 0,4098 g CO_2, 0,1811 g H_2O.

$C_6H_{13}O_2N$. Ber. C 54,96%, H 9,92%.
Gef. „ 54,95%, „ 9,89%.

Für die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens diente die Lösung der Substanz in der berechneten Menge Salzsäure. 0,6352 g Substanz, 10,9630 g Lösung, also Prozentgehalt 5,7940. Spezifisches Gewicht 1,1036. Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr +2,26°. Mithin

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +17,67^\circ.$$

Zur weiteren Charakterisierung wurde noch eine Probe des Leucins racemisiert, mit Phenylisocyanat kombiniert und die Phenylureïdosäure, deren Schmelzpunkt bei 164° lag, durch Kochen mit Salzsäure ins Hydantoïn verwandelt. Letzteres zeigte den richtigen Schmelzpunkt 124—126° und die Zusammensetzung:

0,2100 g Substanz: 0,5176 g CO_2, 0,1335 g H_2O.

$C_{13}H_{16}O_2N_2$. Ber. C 67,24%, H 6,89%.
Gef. „ 67,22%, „ 7,06%.

Die zweite Fraktion, 18 g, löste sich bis auf 3 g in heißem absoluten Alkohol und bestand überwiegend aus Pyrrolidincarbonsäure. Die Ausbeute an letzterer, d. h. in Alkohol löslichem Rohprodukt betrug also im ganzen 4,4% der nicht getrockneten Gelatine.

Fraktion 100—130°.

Sie enthält neben anderen Produkten, deren Natur noch nicht festgestellt ist, Asparaginsäure. Zur Verseifung wurde sie mit der doppelten Menge kristallisierten Barythydrats und der 10-fachen Menge Wasser 2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt, nach völligem Erkalten wurde das ausgeschiedene Baryumsalz filtriert, dann in Wasser suspendiert, mit Schwefelsäure genau zersetzt und die in der Mutterlauge enthaltene Asparaginsäure wie gewöhnlich durch Kristallisation gereinigt.

0,2090 g Substanz: 0,2762 g CO_2, 0,1002 g H_2O.

$C_4H_7O_4N$. Ber. C 36,09%, H 5,26%.
Gef. „ 36,04%, „ 5,33%.

Die Ausbeute an reiner kristallisierter Asparaginsäure betrug nur 2,5 g, in Wirklichkeit ist ihre Menge aber jedenfalls viel größer, da die Abscheidung durch Baryt sehr unvollkommen ist und im wesent-

lichen nur den Teil der Asparaginsäure liefert, der bei der Hydrolyse racemisiert worden ist. Der Hauptteil der aktiven Säure befand sich also noch in den Mutterlaugen, wir haben aber vorläufig auf seine Isolierung verzichtet.

Fraktion 130—160°.

Bei einem Versuch mit 1 kg Gelatine konnte der in dieser Fraktion enthaltene Phenylalaninester direkt durch Schütteln mit der 7-fachen Menge Wasser als Öl abgeschieden und dann in der früher beschriebenen Weise daraus das Phenylalanin gewonnen werden.

Bei einem zweiten Versuch war die Menge des durch Wasser abgeschiedenen Öles so gering, daß seine Untersuchung unmöglich war, aber hier ließ sich das Phenylalanin nach der Verseifung mit Baryt aus der stark konzentrierten wässerigen Lösung durch Einleiten von Salzsäuregas als Hydrochlorat fällen. Das Salz wurde durch Umkristallisieren aus starker Salzsäure gereinigt, dann in wässeriger Lösung mit Natriumacetat zersetzt und das ausgeschiedene Phenylalanin aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Das farblose schön kristallisierte Präparat zeigte die charakteristische Verwandlung in Phenylacetaldehyd und gab folgende Zahlen:

0,2056 g Substanz: 0,4936 g CO_2, 0,1244 g H_2O.

$C_9H_{11}O_2N$. Ber. C 65,45%, H 6,66%.
Gef. „ 65,47%, „ 6,72%.

Nach dem Drehungsvermögen, welches in wässeriger Lösung nur $[\alpha]_D^{20°}$ +12,6° gefunden wurde, war das Präparat ein Gemisch von aktivem und racemischem Phenylalanin.

Neben Phenylalanin enthält die Fraktion auch die Ester der Asparaginsäure und der Glutaminsäure. Die erstere wurde bei der Verseifung mit Baryt wieder als unlösliches Barytsalz gewonnen und daraus isoliert. Ihre Analyse ergab:

0,1960 g Substanz: 0,2598 g CO_2, 0,0886 g H_2O.

$C_4H_7O_4N$. Ber. C 36,09%, H 5,26%.
Gef. „ 36,15%, „ 5,02%.

Zur Gewinnung der Glutaminsäure wurde eine andere Portion des Estergemisches durch Abdampfen mit verdünnter Salzsäure verseift, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und die Flüssigkeit mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Das ausgeschiedene Hydrochlorat, welches Glutaminsäure und Phenylalanin enthielt, ließ sich durch Umkristallisieren aus Salzsäure reinigen und gab dann bei der Zersetzung mit der berechneten Menge Alkali die freie Glutaminsäure. Diese wurde

aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle mehrmals umkristallisiert, bis alles Phenylalanin entfernt war, und gab folgende Zahlen:

0,1956 g Substanz: 0,2944 g CO_2, 0,1106 g H_2O.
0,2009 g „ 0,2987 g CO_2, 0,1092 g H_2O.
0,1887 g „ 15,2 ccm N (16,5°, 767 mm).

$C_5H_9O_4N$.	Ber.	C 40,81%,	H 6,12%,	N 9,52%.
	Gef.	„ 41,05%,	„ 6,28%.	
	„	„ 40,55%,	„ 6,04%.	
	„	—	—	N 9,47%.

Für die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens diente die Lösung der Substanz in der berechneten Menge Salzsäure. 0,6642 g Substanz 11,8812 g Lösung, also Prozentgehalt 5,59, spezifisches Gewicht 1,024. Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr +3,23°. Mithin

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +28,21^\circ,$$

während die Glutaminsäure aus Caseïn unter den gleichen Bedingungen +30,45 gab[1]).

Die Ausbeute an Glutaminsäure war recht gering, denn die Menge des Hydrochlorats betrug nur 1% der Gelatine. Sie stieg allerdings noch etwas bei einem anderen Versuch, wo die Destillation der höher siedenden Ester nicht bei 10 mm, sondern bei etwa 0,5 mm Druck ausgeführt war[2]), und in Wirklichkeit ist die Menge der in der Gelatine enthaltenen Glutaminsäure zweifellos noch erheblich größer, da bei der Darstellung des Esters starke Verluste entstehen.

Zusammenstellung der Resultate.

1. Unter den Spaltprodukten des Leims durch Salzsäure sind sicher nachgewiesen: Glykocoll, *d*-Alanin, *l*-Leucin, Asparaginsäure, *d*-Glutaminsäure, *d*-Phenylalanin und *l*-Pyrrolidincarbonsäure. Neben den aktiven Säuren war aber auch allenthalben die racemische Form vorhanden, welche zweifellos bei der Hydrolyse aus ersterer entstanden ist.

2. Die Bildung von Aminovaleriansäure ist nicht sicher nachgewiesen, aber doch wahrscheinlich gemacht, und nach einigen Be-

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2468. (*S. 105.*)

[2]) Die Destillation bei diesem geringen Druck ist für die leicht zersetzlichen Ester der Aminosäuren besonders zu empfehlen. Man erhält dabei auch Substanzen, welche bei der Destillation unter 8—10 mm sich zersetzen. Speziell in der Gelatine wurde ein derartiges Produkt gefunden, welches nach der Analyse des Kupfersalzes eine Oxyaminosäure zu sein scheint. Über die Einzelheiten des Verfahrens, welches besondere technische Einrichtungen erfordert, wird an anderer Stelle Mitteilung gemacht werden. E. Fischer.

obachtungen ist auch die Anwesenheit von Aminobuttersäure nicht ausgeschlossen.

3. Von den sicher nachgewiesenen Stoffen wurden folgende Mengen isoliert, berechnet in Prozenten auf die getrocknete Gelatine:

Glykocoll	16,5%
Alanin	0,8%
Pyrrolidincarbonsäure	5,2%
Leucin	2,1%
Asparaginsäure	0,56%
Glutaminsäure	0,88%
Phenylalanin	0,4%
	26,44%

Die wirkliche Menge dieser Stoffe, mit Ausnahme des Glykocolls, ist aber jedenfalls erheblich größer, weil sowohl bei der Darstellung der freien Ester, wie auch bei der Isolierung der einzelnen aus den Estern regenerierten Aminosäuren große Verluste unvermeidlich sind.

48. Emil Fischer: Über eine neue Aminosäure aus Leim.

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 35, 2660 (1902).
(Eingegangen am 9. Juli.)

Vor kurzem habe ich darauf aufmerksam gemacht, daß bei der hydrolytischen Spaltung der Proteïnstoffe neben den gewöhnlichen Aminosäuren auch Oxyderivate derselben entstehen, die man bisher kaum beachtet hat. So gelang es Skita und mir[1]), das Serin, welches Kramer aus dem Seidenleim gewann, auch in dem Seidenfibroïn zu finden. Ich kann jetzt zufügen, daß dieser Stoff, nach Versuchen des Herrn Th. Dörpinghaus, aus dem tierischen Horn entsteht, und nach den jüngsten Erfahrungen im hiesigen Laboratorium habe ich Grund, anzunehmen, daß er auch im Leim, Caseïn und manchen anderen Proteïnstoffen enthalten ist. Ich bin ferner überzeugt, daß kohlenstoffreichere Oxyaminosäuren noch in größerer Zahl unter den Spaltungsprodukten der Eiweißkörper vorhanden sind, denn es ist mir gelungen, eine derselben von der Formel $C_5H_9O_3N$ aus dem Leim zu isolieren. Dieselbe ist in Wasser äußerst leicht löslich, wird durch Phosphorwolframsäure aus verdünnter saurer Lösung nicht gefällt und läßt sich auch schwerer als die gewöhnlichen Monoaminosäuren in Form ihrer Ester gewinnen. Infolgedessen bedarf es für ihre Isolierung eines neuen und recht umständlichen Scheidungsverfahrens.

Käufliche Gelatine wird in der früher beschriebenen Weise[2]) hydrolysiert, die Lösung verdampft und auf die Ester der gewöhnlichen Aminosäuren verarbeitet. Nach dem Ausäthern der letzteren bleibt eine dickbreiige, dunkle Masse, welche große Mengen Kalisalze, ferner die Diaminosäuren, den Rest der Monoaminosäuren und die obenerwähnte Oxyaminosäure enthält. Sie wird in Wasser gelöst, mit Salzsäure schwach übersättigt, auf dem Wasserbade eingedampft und die auskristallisierenden Salze von Zeit zu Zeit durch Filtration entfernt. Zum Schluß wird der dicke, braune Sirup mit dem gleichen Volumen Alkohol, der etwas gasförmige Salzsäure enthält,

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 223. (*S. 687.*)
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 72. (*S. 672.*)

versetzt, die Mutterlauge im Vakuum verdampft, der Rückstand nochmals mit salzsäurehaltigem Alkohol behandelt und abermals verdampft. Damit die Monoaminosäuren möglichst entfernt werden, ist es nötig, den Rückstand wieder, wie zuerst, mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure zu verestern und dieselbe Operation, d. h. Abscheidung der Ester mit Kaliumcarbonat und Alkali, Ausäthern usw. zu wiederholen.

Während 1 kg Gelatine bei der ersten Operation außer 260 g salzsaurem Glykocollester noch 233 g destillierbaren Ester gab, wurden bei der zweiten Operation 6 g salzsaurer Glykocollester und 68 g destilliertes Estergemisch gewonnen.

Der Rückstand, welcher die Salze, Diaminosäuren und einen Teil der Oxyaminosäure enthält, wird wieder in Wasser gelöst, mit Salzsäure übersättigt und unter zeitweiser Filtration der ausgeschiedenen Salze bis zum Sirup eingeengt. Durch Auslaugen desselben mit salzsäurehaltigem, absolutem Alkohol, Eindampfen und abermaliges Auslaugen mit Alkohol, dem etwas gasförmige Salzsäure zugeführt ist, lassen sich die anorganischen Salze bis auf einen verschwindend kleinen Rest entfernen. Man erhält schließlich einen dunklen Sirup, in welchem die Aminosäuren als Hydrochlorate enthalten sind.

Zur Entfernung der überschüssigen Salzsäure verdampft man mehrmals, schüttelt dann in kalter, wässeriger Lösung mit Silbersulfat, bis alles Chlor entfernt ist, behandelt das Filtrat mit Schwefelwasserstoff, um überschüssiges Silber zu fällen, und versetzt die Mutterlauge nach Verjagung des Schwefelwasserstoffs mit einer Lösung von Phosphorwolframsäure. Dabei fällt zuerst ein kristallinischer Niederschlag, später folgt eine amorphe, zähe Masse. Es ist deshalb ratsam, die Fällung fraktioniert auszuführen. Bei Anwendung von 1 kg Gelatine wurden 1100 g Phosphorwolframsäure verbraucht und die Fällung geschah in 4 Fraktionen, von denen die letzte, mit 200 g Phosphorwolframsäure ausgeführt, eine zähe klumpige Masse bildete.

Die wässerige Mutterlauge wird zur Entfernung der Phosphorwolframsäure mit überschüssigem Baryumhydroxyd und mit Kohlensäure behandelt und das Filtrat genau mit Schwefelsäure gefällt. Die letzte Mutterlauge hinterläßt beim Verdampfen einen dicken, hellbraun gefärbten Sirup, welcher nach mehrtägigem Stehen im Vakuumexsikkator Kristalle abscheidet. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß die zahlreichen Verdampfungen meistens unter stark vermindertem Druck ausgeführt wurden, weil bei höherer Temperatur eine zwar sehr langsame, aber doch merkliche Zersetzung der Aminosäuren eintritt.

Die eben erwähnten Kristalle sind die neue Oxyaminosäure. Sie werden zunächst von der dicken Mutterlauge durch Absaugen auf einem Filter und später durch scharfes Abpressen zwischen Papier befreit. Die Mutterlauge gibt beim weiteren Verdunsten über Schwefelsäure eine neue Kristallisation. Aus 1 kg Gelatine wurden im ganzen 30 g kristallisiertes Rohprodukt gewonnen. Zur Reinigung wird dasselbe in ungefähr der gleichen Menge warmem Wasser gelöst. Beim Erkalten und noch reichlicher beim Stehen über Schwefelsäure scheiden sich dann prachtvoll ausgebildete, farblose Tafeln ab.

Die nachfolgenden Messungen verdanke ich Herrn Dr. von Wolff, Assistent am mineralogisch-petrographischen Institut der Berliner Universität.

Kristallsystem: rhombisch.

Achsenverhältnis: $\breve{a} : \bar{b} : \acute{c} = 0{,}59405 : 1 : 0{,}3579$.

Beobachtete Formen (vgl. Tafel): $b = \infty P \breve{\infty}$ (010), $m = \infty P$ (110), $s = \infty P \breve{2}$ (120), $d = P \bar{\infty}$ (101).

Fig. 2.

Optisches Schema: $\breve{a} = \mathfrak{b}$, $\bar{b} = \mathfrak{c}$, $\acute{c} = \mathfrak{a}$.

Ausführliche Mitteilung wird Herr von Wolff selbst später an anderer Stelle machen.

Die im Vakuumexsikkator getrocknete Substanz verliert bei 100° nicht an Gewicht und gab die der Formel $C_5H_9O_3N$ entsprechenden Werte.

0,1931 g Sbst.: 0,3234 g CO_2, 0,1219 g H_2O. — 0,2573 g Sbst.: 24,3 ccm N (15°, 757 mm).

$C_5H_9O_3N$.	Ber. C 45,80,	H 6,86,	N 10,69.
	Gef. „ 45,68,	„ 7,01,	„ 11,02.

Die wässerige Lösung dreht stark nach links.

1,1002 g Sbst. in 11,795 g Lösung, mithin Prozentgehalt 9,328. Spezifisches Gewicht 1,032. Drehung bei Natriumlicht im 2-Dezimeterrohr 15,60° nach links.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} - 81{,}04.$$

Im Kapillarrohr erhitzt, zersetzt sich die Verbindung gegen 270° unter Aufschäumen und Bräunung. Beim stärkeren Erhitzen wird sie zum größten Teile in flüchtige Produkte verwandelt, welche einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan stark röten, was auf die Anwesenheit von Pyrrol hindeutet. Dieselbe Reaktion erhält man übrigens auch bei anderen Oxyaminosäuren, was bisher, wie es scheint, nicht beobachtet wurde; so geben sie das Serin und das Isoserin bei der trocknen Destillation ziemlich stark. Daß die Glutaminsäure sich ebenso verhält, ist bereits bekannt.

Die neue Oxyaminosäure ist, wie erwähnt, in Wasser äußerst leicht, in absolutem Alkohol dagegen sehr wenig löslich. Die wässerige Lösung schmeckt stark süß[1]).

Ihr Kupfersalz, welches in der üblichen Weise durch Kochen der wässerigen Lösung mit gefälltem Kupferoxyd bereitet werden kann, ist tief blau, in Wasser sehr leicht löslich und kristallisiert schwierig. In Alkohol ist es unlöslich.

Die Verbindung mit Phenylisocyanat ist in Wasser verhältnismäßig leicht löslich. Für ihre Bereitung wird eine 10-prozentige wässerige Lösung mit der für $1^1/_4$ Mol. berechneten Menge Natronlauge versetzt und dann bei 0^0 Phenylcyanat unter starkem Schütteln zugetropft, bis die Abscheidung von Diphenylharnstoff beginnt. Das Filtrat scheidet beim schwachen Übersättigen mit Salzsäure feine Nädelchen ab. Durch Verdampfen der Mutterlauge unter stark ver-

---

[1]) Der Geschmack steht bei den Aminosäuren in einer gewissen Abhängigkeit von der Struktur, und da er manchmal auch zur Unterscheidung dieser sonst so ähnlichen Stoffe dienen kann, so scheint es mir nützlich, meine Erfahrungen über diese Eigenschaft zusammenzufassen.

Süß schmecken alle von mir geprüften einfachen α-Aminosäuren der aliphatischen Reihe (vgl. W. Sternberg, Chem. Centralblatt **1899** II, 58). Kostet man die festen Substanzen, so ist die Empfindung, wie leicht begreiflich, schwächer bei den schwerer löslichen Produkten. Bekannt ist der süße Geschmack beim Glykocoll, Alanin, Leucin. Ich führe dann weiter noch als von mir geprüft an: Synthetische α-Aminobuttersäure, α-Amino-*n*-valeriansäure, α-Amino-iso-valeriansäure und α-Amino-*n*-capronsäure.

Bei den β-Aminosäuren tritt der süße Geschmack zurück; denn die β-Amino buttersäure ist fast geschmacklos und die β-Amino-iso-valeriansäure schmeckt sehr schwach süß und hinterher schwach bitter.

Die einzige γ-Aminosäure, die mir zur Verfügung stand, die γ-Aminobuttersäure, ist gar nicht mehr süß, sondern hat nur einen schwachen, faden Geschmack.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Oxyaminosäuren, denn das Serin (α-Amino-β-oxypropionsäure) und die α-Amino-γ-oxyvaleriansäure sind recht süß, während dem Isoserin (β-Amino-α-oxypropionsäure) diese Eigenschaft gänzlich fehlt.

Die α-Pyrrolidincarbonsäure schließt sich den aliphatischen Verbindungen an, denn sie schmeckt stark süß.

Anders liegen die Verhältnisse in der aromatischen Gruppe. Die Phenylaminoessigsäure ($C_6H_5.CH[NH_2].COOH$) und das Tyrosin sind nahezu geschmacklos, sie schmecken ganz schwach fade, etwa wie Kreide. Im Gegensatz dazu steht das Phenylalanin ($C_6H_5.CH_2.CH[NH_2].COOH$), welches süß ist.

Bei den zweibasischen Aminosäuren zeigen sich ebenfalls Unterschiede. So schmeckt die Glutaminsäure schwach sauer und hinterher fade, während die Asparaginsäure stark sauer ist, ungefähr wie Weinsäure.

Der angenehme Geschmack der meisten α-Aminosäuren steht offenbar in gewissem Zusammenhang mit ihrem Vorkommen in den Proteïnstoffen, und diese Beziehung erinnert ferner an die Beobachtungen von O. Emmerling (Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2289) über das Verhalten der verschieden konstituierten Aminosäuren gegenüber einigen Schimmelpilzen.

mindertem Druck gewinnt man eine zweite Kristallisation. Zur Reinigung wurden die filtrierten und abgepreßten Kristalle in der 4-fachen Menge heißen Alkohols gelöst und durch vorsichtigen Zusatz von Äther wieder abgeschieden. Die Substanz bildet dann feine, farblose, meist zu Büscheln verwachsene Blättchen, welche im Kapillarrohr gegen 175° unter Zersetzung schmelzen. Ihre Zusammensetzung ist $C_{12}H_{14}O_4N_2$.

0,1979 g Sbst.: 0,4169 g CO_2, 0,1022 g H_2O. — 0,1855 g Sbst.: 18,0 ccm N (18°, 753 mm).

Ber. C 57,60, H 5,60, N 11,20.
Gef. „ 57,45, „ 5,73, „ 11,10.

Sie entsteht mithin aus gleichen Molekülen Aminosäure und Phenylcyanat.

Die neue Säure unterscheidet sich von der Pyrrolidincarbonsäure durch den Mehrgehalt von 1 Sauerstoff und von dem Anhydrid der Glutaminsäure, der Pyrrolidoncarbonsäure durch den Mehrgehalt von 2 Wasserstoff. Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß sie eine Oxypyrrolidincarbonsäure sei, und es war zu erwarten, daß es möglich sein würde, sie durch Reduktion in Pyrrolidincarbonsäure überzuführen oder vielleicht auch aus dem Anhydrid der Glutaminsäure synthetisch zu gewinnen. Der Versuch, den letzten Vorgang durch Erhitzen mit Jodwasserstoff und Phosphor zu realisieren, ist mißlungen. Erfolgreicher war die Reduktion der Oxyaminosäure selbst, denn es bildet sich dabei α-Pyrrolidincarbonsäure; allerdings geht die Reaktion keineswegs glatt vonstatten, wie folgender Versuch zeigt:

1 g Oxyaminosäure wurde mit 0,25 g Phosphor und 6 ccm Jodwasserstoffsäure (spez. Gewicht 1,96) im geschlossenen Rohr 5 Stunden auf 150° erhitzt, dann die farblose Lösung mit Wasser verdünnt, unter stark vermindertem Druck bis zum Sirup verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst und bis zur völligen Fällung des Jodwasserstoffs und der Phosphorsäure mit Silbercarbonat geschüttelt. Das mit Schwefelwasserstoff vom Silber befreite Filtrat hinterließ beim Verdampfen eine sirupförmige Säure, welche in Wasser leicht löslich war und große Mengen Jod enthielt. Um dieses zu eliminieren, wurde die Lösung in 10 ccm Wasser in der Kälte mit Natriumamalgam unter zeitweisem Zusatz von Schwefelsäure geschüttelt, schließlich ein Überschuß von Schwefelsäure zugegeben und das Natriumsulfat durch Zugabe von Alkohol gefällt. Nachdem aus dem Filtrat der Alkohol unter vermindertem Druck abdestilliert war, wurde Schwefelsäure und Jodwasserstoff durch kurzes Kochen mit Bleihydroxyd entfernt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und nach Verjagung des Schwefelwasserstoffs mit gefälltem Kupferoxyd gekocht. Als die tiefblaue Lösung

jetzt stark konzentriert war, schied sich in der Kälte ein Kupfersalz in dunkelblauen Blättchen ab, welche alle Eigenschaften des racemischen α-pyrrolidincarbonsauren Kupfers besaß. Für die Analyse war das Salz nochmals aus Wasser umkristallisiert.

0,2186 g lufttrocknes Salz verloren bei 105° 0,0247 g Wasser.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$. Ber. H_2O 10,99. Gef. H_2O 11,30.

0,1355 g wasserfreies Salz lieferten 0,0365 g CuO, 0,2025 g CO_2, 0,0738 g H_2O. — 0,1939 g Sbst.: 0,0521 g CuO, 0,2896 g CO_2, 0,1000 g H_2O.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$.				
	Ber.	Cu 21,81,	C 41,15,	H 5,48,
	Gef.	„ 21,51, 21,46,	„ 40,76, 40,73,	„ 6,05, 5,74.

Diese Zahlen genügen für die Charakterisierung des Salzes, zeigen aber andererseits deutlich, daß das Präparat noch nicht ganz rein war. In der Tat wird bei dem oben geschilderten Verfahren noch eine andere Aminosäure gebildet, deren Kupfersalz sich hauptsächlich in der Mutterlauge findet und daraus beim weiteren Verdampfen kristallisiert. Mangel an Material hat seine genaue Untersuchung bisher verhindert; vielleicht handelt es sich um eine Aminofettsäure, welche durch weitergehende Reduktion aus der Pyrrolidincarbonsäure entstehen könnte.

Daß bei der Reduktion der aktiven Oxyaminosäure racemische Pyrrolidincarbonsäure resultiert, ist nicht auffallend, da die konzentrierte Jodwasserstoffsäure bei der angewandten hohen Temperatur racemisierend wirkt.

Jedenfalls kann man aus dem Resultat des Versuches den recht wahrscheinlichen Schluß ziehen, daß die neue Aminosäure eine Oxypyrrolidin-α-carbonsäure ist. Leider liegt bisher keine Beobachtung vor, welche ein Urteil über die Stellung des Hydroxyls gestattete.

Schon bei der Auffindung der Pyrrolidincarbonsäure unter den Spaltprodukten der Proteïnstoffe habe ich die Frage diskutiert, ob sie vielleicht sekundär aus anderen Hydrolysierungsprodukten entstehe, und ich betrachte diese Vermutung noch immer nicht als endgültig widerlegt, obschon manche Beobachtungen in negierendem Sinne ausfielen. Die gleiche Frage kann bei der vorliegenden Oxyaminosäure aufgeworfen werden, und ich werde darauf zurückkommen, wenn die Struktur der Verbindung völlig ermittelt ist.

Bei diesen Versuchen bin ich von Herrn Dr. O. Wolfes aufs eifrigste unterstützt worden, wofür ich ihm auch hier besten Dank sage.

49. Emil Fischer und Aladar Skita: Über das Fibroïn und den Leim der Seide.

Zeitschrift für physiologische Chemie 35, 221 (1902).
(Eingegangen am 18. März.)

In der ersten Mitteilung[1]) haben wir gezeigt, daß das Seidenfibroïn vorzugsweise aus Monoaminosäuren zusammengesetzt ist, unter denen Glykocoll und Alanin an Menge bei weitem überwiegen und einen größeren Prozentgehalt ausmachen, als in irgend einem anderen Proteïnstoff bisher gefunden wurde.

Es schien uns deshalb die Möglichkeit nicht ausgeschlossen zu sein, daß hier ein besonders reines Material vorliege, in dem die Diaminosäuren gar nicht vorhanden seien.

Zwar hat Wetzel angegeben, daß unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten Histidin sich befinde; aber es war zweifelhaft, wie wir schon früher hervorhoben, ob das von ihm untersuchte Material rein gewesen sei.

Wir haben deshalb ein besonders sorgfältig gereinigtes Fibroïn der Hydrolyse unterworfen und auf Diaminosäuren geprüft. Ihre Menge war allerdings sehr gering, aber es konnte doch Arginin mit voller Sicherheit nachgewiesen werden. Bei dieser Gelegenheit wurde eine Lücke der früheren Arbeit ausgefüllt, indem es gelang, die schon damals vermutete Anwesenheit von Serin in den Spaltungsprodukten des Fibroïns zu beweisen. Wir glauben diese Beobachtung besonders hervorheben zu dürfen, da das Serin, welches zurzeit noch die einzige natürliche Oxyaminosäure der aliphatischen Reihe ist, bisher nur im Seidenleim aufgefunden wurde, und wir machen von neuem darauf aufmerksam, daß diese Oxyaminosäuren eine bis jetzt gar nicht gewürdigte große Bedeutung für das Studium der Proteïne haben.

Wesentlich verschieden vom Fibroïn ist in den äußeren Eigenschaften der Seidenleim, und wir haben deshalb auch die Zusammensetzung dieses Materials mit den neuen Methoden geprüft. Wie schon in der ersten Mitteilung erwähnt wurde, liefert derselbe bei der Hydro-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 177 [1901]. (*S. 654.*)

lyse eine reichliche Menge von Diaminosäuren, unter denen wir jetzt das Arginin sicher nachgewiesen haben. Aber der Unterschied in der Zusammensetzung von Seidenleim und Fibroïn scheint doch wesentlich nur ein quantitativer zu sein; denn die Monoaminosäuren, welche dort gefunden wurden, scheinen auch hier vorhanden zu sein. Neben dem von Cramer nachgewiesenen Tyrosin und Serin haben wir gefunden Alanin und Spuren von Glykocoll. Für den Nachweis von Leucin und Phenylalanin fehlte uns das Material.

Spaltungsprodukte des Fibroïns.

Serin. Werden die Ester der Monoaminosäuren auf die früher beschriebene Weise bei 8—10 mm Druck destilliert, so befindet sich der Serinester in der Fraktion 90—140°. Aber es ist schwierig, aus diesem Material die reine Oxyaminosäure zu isolieren, weil bei der Destillation Zersetzungen eintreten, welche die Menge der Aminosäure verringern und schwer zu entfernende Nebenprodukte entstehen lassen. Diese Schwierigkeit wird beseitigt, wenn die Destillation bei viel niedrigerem Druck stattfindet. Wir haben deshalb das Gemisch der Ester zunächst auf dem Wasserbade bei 8—10 mm Druck abdestilliert und die weitere Fraktionierung bei 0,5 mm ausgeführt. Bei einer Temperatur des Bades von 100—120° wurde eine Fraktion der Ester gewonnen, welche bei Anwendung von 250 g Fibroïn 8 g betrug und den Ester des Serins enthielt. Diese Fraktion wurde zunächst mit etwa der 5-fachen Menge Petroläther durchgeschüttelt und der ungelöste Teil, dessen Menge 6 g betrug, mit einer Lösung von 12 g Barythydrat in 60 ccm Wasser durch dreistündiges Erwärmen auf dem Wasserbade verseift. Nach der genauen Ausfällung des Barythydrates durch Schwefelsäure gab die Lösung beim Verdampfen etwas mehr wie 4 g kristallisiertes Serin.

Nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser hatte das Präparat den Schmelzpunkt 245° (korr.) und die Zusammensetzung des Serins.

0,1823 g Substanz gaben 0,2279 g CO_2 und 0,1100 g H_2O.
0,2147 g „ lieferten 24,6 ccm N bei 16,5° und 756 mm Druck.

$C_3H_7O_3N$. Ber. C 34,30%, H 6,67%, N 13,30%.
Gef. „ 34,09%, „ 6,70%, „ 13,29%.

Die Menge des isolierten Serins betrug 1,6% des Fibroïns. In Wirklichkeit ist dieselbe aber jedenfalls erheblich größer, da bereits bei der Darstellung und Isolierung des Esters starke Verluste unvermeidlich sind.

Diaminosäuren. Für die Aufsuchung derselben dienten die letzten Mutterlaugen, welche blieben, als nach der Hydrolyse mit

25-prozentiger Schwefelsäure[1]) und genauer Entfernung der Säure durch Barythydrat, aus der eingedampften Lösung die Monoaminosäuren herauskristallisiert waren. Sie wurden zunächst auf 150 ccm verdünnt und dann nach dem Verfahren von Kossel[2]) untersucht. Das Arginin wurde in Form des bekannten Argininsilbernitrats $C_6H_{14}N_4O_2 . HNO_3 + AgNO_3$ isoliert. Die Verbindung zeigte den Schmelzpunkt 183—184°.

0,0910 g Substanz gaben beim Glühen 0,0243 g oder 26,70% Ag.

Ber. Ag 26,53.

Sie drehte schwach nach rechts.

Die Menge des Arginins aus der Silberverbindung berechnet betrug 1% des Fibroïns. Für das Histidin und Lysin wurden bei dem Kosselschen Verfahren die entsprechenden Niederschläge erhalten, aber doch so wenig, daß der weitere Nachweis nicht mit Sicherheit geführt werden konnte.

Seidenleim.

Zur Darstellung des Seidenleims haben wir gelbe, lombardische Rohseide zweimal mit je 25 Teilen Wasser jedesmal 3 Stunden im Autoklaven im großen Porzellanbecher auf 118° erhitzt und dann die wässerige Lösung verdampft. Die Ausbeute betrug ungefähr 25% der Rohseide, und das erhaltene Produkt war eine dunkle, glasige, leimähnliche Masse, die wir absichtlich ohne weitere Reinigung zur Hydrolyse benutzt haben. Letztere wurde für die Untersuchung auf Diaminosäuren in folgender Weise mit verdünnter Schwefelsäure ausgeführt. 1 Teil Seidenleim wurde mit einem Gemisch von 2 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 8 Teilen Wasser am Rückflußkühler 24 Stunden gekocht, die Schwefelsäure mit Barythydrat genau ausgefällt und die Flüssigkeit mit Tierkohle entfärbt. Beim Eindampfen, das am besten bei vermindertem Druck vorgenommen wird, kristallisiert zuerst das Tyrosin, von dem durch die optische Untersuchung der Lösung in 21-prozentiger Salzsäure festgestellt wurde, daß gewöhnliches *l*-Tyrosin vorlag. Später folgt, aber ziemlich langsam, das Serin. Die dann verbleibenden Mutterlaugen dienten für den Nachweis der Diaminosäuren.

Diese Untersuchung geschah wieder nach dem Verfahren von Kossel. Das Argininsilbernitrat hatte den Schmelzpunkt 183—184° und die spez. Drehung $[\alpha]_D^{20°} = +5{,}0$ (während Gulewitsch $\alpha = +5{,}6$ fand[3]).

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 177 [1901]. (*S. 654.*)

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 176 und **26**, 588 [1898].

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**, 178 [1899].

0,1720 g Substanz gaben beim Glühen 0,046 g Ag, berechnet 26,53%, gefunden 26,74% Ag.

Aus der Silberverbindung berechnet, betrug die Menge des Arginins 4% des Seidenleims, war also 4 mal so groß als bei dem Fibroïn.

Das Lysin wurde als Pikrat isoliert. Leider ist die Analyse des gereinigten Präparats, dessen Menge sehr klein war, mißglückt.

Für die Aufsuchung der Monoaminosäuren mittels der Estermethode wurde eine neue Menge Seidenleim, genau so wie es beim Fibroïn beschrieben ist[1]), durch Salzsäure hydrolysiert und die Aminosäuren in die Ester übergeführt. Die Menge des Glykocolls ist so gering, daß aus der salzsauren alkoholischen Lösung das Hydrochlorat nicht auskristallisierte. Bei der Destillation der Ester, welche aus 120 g Seidenleim gewonnen waren, ergaben sich folgende Fraktionen.

a) Destillation bei 8—10 mm Druck:

1. Fraktion	43—75°	. . . .	10,5 g
2. ,,	75—80°	. . . .	1,0 ,,

b) Destillation bei 0,5 mm Druck:

3. Fraktion	bis 100°	(Temperatur des Bades)	1,0 g
4. ,,	100—125°	,, ,, ,,	18,0 ,,
5. ,,	125—180°	,, ,, ,,	3,0 ,,

Glykocoll. Aus der ersten Fraktion (43—75°) wurden zunächst etwa $1^1/_2$ ccm abdestilliert, mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt und Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach dem Einimpfen und langem Stehen bei niederer Temperatur war salzsaurer Glykocollester aus der Lösung gefallen. Nach dem Umkristallisieren aus Alkohol hatte das Präparat den Schmelzpunkt 144°. Seine Menge betrug nur 0,2 g oder 0,1% des Seidenleims, während aus dem Fibroïn 36% Glykocoll isoliert wurden.

Alanin. Der übrige Teil der ersten Fraktion war zumeist Alaninester. Dieser wurde mit der 10-fachen Menge Wasser verseift und das Alanin durch Kristallisation gereinigt.

0,1744 g Substanz gaben 0,2575 g CO_2 und 0,1242 g H_2O.

Ber. C 40,45%, H 7,86%.
Gef. ,, 40,27%, ,, 7,91%.

Das Präparat schmolz unter Zersetzung bei 297°. Seine Menge betrug 5% des Seidenleims. Die optische Untersuchung des salzsauren Salzes zeigte, daß es sich wieder um *d*-Alanin handelte.

Die zweite und dritte Fraktion war zu gering, um eine Untersuchung der Aminosäuren zu gestatten.

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 177 [1901]. (*S. 654.*)

Die vierte Fraktion, welche den Serinester enthielt, wurde zunächst mit der 7-fachen Menge Wasser geschüttelt, das ungelöste Öl mit Äther aufgenommen und die ätherische Lösung noch 2 mal mit Wasser durchgeschüttelt. Schließlich blieb in dem Äther der Ester einer Aminosäure zurück, die durch Verseifen mit Baryt gewonnen werden kann. Sie ist im Wasser ziemlich leicht löslich, unterscheidet sich von dem Phenylalanin durch die große Löslichkeit in konzentrierter Salzsäure und scheint eine bisher unbekannte Verbindung zu sein, deren nähere Untersuchung später ausgeführt werden soll. Die wässerige Lösung enthält den Serinester. Sie wurde mit Baryt verseift und die Lösung in üblicher Weise verarbeitet gab 8 g reines Serin.

0,1825 g Substanz gaben 0,2304 g CO_2 und 0,1121 g H_2O.

Ber. C 34,30%, H 6,67%.
Gef. „ 34,43%, „ 6,82%.

Der Schmelzpunkt wurde wieder bei 240° (korr. 245°) gefunden.

Die optische Inaktivität des Serins wurde durch die Prüfung des Hydrochlorates kontrolliert. Seine 10-prozentige Lösung zeigte im 2-Dezimeterrohre keine wahrnehmbare Drehung.

Phenylisocyanatserin. Diese Verbindung wurde in üblicher Weise durch Einwirkung von Phenylisocyanat auf die alkalische Lösung der Aminosäure dargestellt und zeigte sich völlig identisch mit dem Produkt, das aus dem synthetischen Serin[1]) auf gleiche Art gewonnen war.

0,1822 g Substanz lieferten 0,3598 g CO_2 und 0,0891 g H_2O.

Ber. C 53,57%, H 5,35%.
Gef. „ 53,81%, „ 5,43%.

Der Schmelzpunkt wurde bei 167° (korr. 170°) gefunden. Auch diese Verbindung war in alkalischer Lösung völlig inaktiv.

---

[1]) E. Fischer und H. Leuchs, Sitzungsberichte der Berliner Akademie, 1902, 78. (*S. 253.*)

50. Emil Fischer: Notizen.

Zeitschrift für physiologische Chemie 35, 227 (1902).
(Eingegangen am 18. März.)

I. Bildung von α-Pyrrolidincarbonsäure bei der Hydrolyse des Caseïns durch Alkali.

II. Quantitative Bestimmung des Glykocolls.

I. Bei der Beschreibung der Versuche, welche zur Auffindung der Pyrrolidincarbonsäure unter den Spaltungsprodukten des Caseïns nach der Hydrolyse mit Salzsäure geführt haben, wurde schon die Frage diskutiert, ob diese zyklische Aminosäure nicht sekundär aus anderen Produkten durch die Wirkung der Mineralsäure entstanden sei.

Obschon einige triftige Gründe gegen diese Annahme angeführt werden konnten, so schien es mir doch erwünscht, auch die Hydrolyse des Caseïns durch Alkali von diesem Gesichtspunkte aus zu untersuchen.

Zu dem Zweck wurden 200 g Caseïn in 1 L 10-prozentiger Natronlauge gelöst und auf 100° erhitzt, bis die Biuretreaktion der Flüssigkeit fast ganz verschwunden war. Das dauerte 65 Stunden. Die Hydrolyse geht also hier sehr viel langsamer vonstatten als beim Kochen mit Säuren. Die anfangs ziemlich starke Ammoniakentwickelung war zum Schluß recht schwach geworden. Die erkaltete Flüssigkeit wurde jetzt mit Salzsäure nahezu neutralisiert und eingedampft, bis die Abscheidung des Chlornatriums begann. Zur Isolierung der Pyrrolidincarbonsäure war die Verwandlung in Ester nicht zu umgehen. Um dabei aber längeres Erwärmen mit der Salzsäure möglichst zu vermeiden, bin ich folgendermaßen verfahren:

Die sehr konzentrierte wässerige Lösung wurde nach dem Erkalten mit alkoholischer Salzsäure schwach angesäuert, mit 1 L absolutem Alkohol vermischt, vom ausgeschiedenen Kochsalz filtriert und bei 15 bis 20 mm Druck aus einem Bade von 40—50° bis zum dicken Sirup eingedampft. Letzterer wurde mit $1^1/_2$ L Alkohol unter Erwärmen durchgeschüttelt, zum Schluß unter Zugabe von einigen Kubikzentimetern alkoholischer Salzsäure. Dabei blieb eine zähe Masse zurück, auf deren Untersuchung ich verzichtet habe.

Die alkoholische Lösung wurde filtriert und mit gasförmiger Salzsäure nahezu gesättigt, ohne die dabei eintretende Erwärmung zu mäßigen. Die Operation dauerte $^3/_4$ Stunden. Die erkaltete Flüssigkeit wurde nach 12-stündigem Stehen wieder bei stark vermindertem Druck aus einem Bade von etwa 45° bis zum Sirup eingedampft und dann die Ester der Aminosäuren in der früher beschriebenen Weise abgeschieden, getrocknet und destilliert.

Die Fraktion von 60—95° (bei 10 mm Druck) wog 23 g. Sie wurde durch Kochen mit Wasser verseift und die Aminosäuren durch Kristallisation in 3 Fraktionen zerlegt. Die leicht lösliche Fraktion, im Gewichte von 10 g, gab an kochenden absoluten Alkohol die Hälfte ab, und dieser lösliche Teil bestand hauptsächlich aus Pyrrolidincarbonsäure. Für die Trennung der aktiven und der racemischen Form diente die Kupferverbindung. Von dem racemischen Salz wurden 3 g isoliert.

0,3159 g verloren bei 109° 0,0345 g und gaben 0,0770 g CuO.

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$. Ber. H_2O 10,99%, Cu 19,39%.
Gef. „ 10,92%, „ 19,45%.

Die Menge des aktiven Salzes war viel geringer, sie betrug nur 0,7 g.

Aus obigen Betrachtungen folgt, daß bei der Hydrolyse des Caseïns mit Alkali die Pyrrolidincarbonsäure in einer Menge entsteht, welche sich nach der Quantität der in Alkohol löslichen Säure auf 2,5% und nach der Menge der Kupfersalze auf 1,3% berechnet. Bei der Hydrolyse mit Salzsäure wurden 3,2% gefunden, aber die Operation war mit größeren Mengen ausgeführt, wo die Verluste geringer sind, und außerdem ist die Hydrolyse mit Salzsäure bei den Aminosäuren vollständiger als die Spaltung mit Alkali unter den angegebenen Bedingungen. Aus den sämtlichen Beobachtungen glaube ich also den Schluß ziehen zu dürfen, daß die Bildung der Pyrrolidincarbonsäure unabhängig davon ist, ob die Hydrolyse mit Säuren oder mit Alkalien bewerkstelligt wird. Daß bei Anwendung von Alkali hauptsächlich racemische Aminosäure entsteht, erklärt sich durch die lange Dauer des Erhitzens.

II. Während man für die Polyaminosäuren Lysin, Arginin und Histidin vortreffliche Abscheidungsmethoden kennt, ist von den Monoaminosäuren, welche bei der hydrolytischen Spaltung der Proteïnstoffe entstehen, bisher nur für das Tyrosin eine ausreichend genaue quantitative Bestimmung möglich gewesen.

Vor kurzem habe ich nun gemeinschaftlich mit A. Skita in der Untersuchung über das Fibroïn der Seide[1]) gezeigt, daß man das Gly-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 177. (*S. 654.*)

kocoll recht gut von den anderen Aminosäuren durch die Kristallisation des salzsauren Äthylesters trennen und zur Wägung bringen kann. Das gleiche Verfahren wurde für die Bestimmung des Glykocolls unter den Spaltprodukten des Leims[1]) angewandt, und ich zweifle nicht daran, daß die Methode sich wegen der bequemen Ausführung bald allgemein einbürgern wird.

Aus diesem Grunde habe ich es aber für nützlich gehalten, ihre Zuverlässigkeit nachträglich noch durch einige Versuche mit reinem Glykocoll zu prüfen.

5,036 g wurden fein zerrieben, mit 40 ccm absolutem Alkohol übergossen, dann mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und 15 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt, bis alles gelöst war. Beim Erkalten schied die Flüssigkeit sofort den salzsauren Glykocollester ab, der nach 12-stündigem Stehen im Eisschrank abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 100° getrocknet wurde. Erhalten 8,9 g oder 95% der Theorie. Aus den alkoholischen Mutterlaugen wurden durch Eindampfen und Fällung mit Äther noch 0,191 g oder 2,04% der Theorie gewonnen, so daß die Gesamtausbeute 97% der Theorie betrug.

Bei den Gemischen von Aminosäuren, welche aus den Proteïnstoffen entstehen, erfolgt die Kristallisation des salzsauren Glycinesters viel langsamer, so daß es sich empfiehlt, die salzsaure alkoholische Flüssigkeit 24 Stunden bei 0° stehen zu lassen. Aber auch dann ist die Abscheidung noch nicht so vollständig, wie beim vorhergehenden Experiment, und man findet deshalb kleine Mengen Glykocoll später noch, wenn man die niedrig siedenden Fraktionen der Ester wieder mit alkoholischer Salzsäure behandelt.

Um einen Anhaltspunkt dafür zu gewinnen, auf welchen Grad von Genauigkeit man in solchen Fällen rechnen darf, habe ich folgenden Versuch mit Caseïn, welches selbst nur Spuren Glykocoll enthält, ausgeführt.

25 g wurden in der früher beschriebenen Weise mit Salzsäure hydrolysiert, dann 5 g Glykocoll zugesetzt, unter stark vermindertem Druck zum dicken Sirup eingedampft, mit heißem Alkohol aufgenommen, vom ungelösten Salmiak filtriert, wieder verdampft, um das Wasser möglichst zu entfernen, und schließlich mit 150 g absolutem Alkohol in der gewöhnlichen Weise verestert. Nach Einimpfung eines Kriställchens von salzsaurem Glykocollester blieb die alkoholische salzsaure Lösung erst 15 Stunden im Eisschrank, dann noch 4 Stunden in einer Mischung von Salz und Eis stehen. Die ausgeschiedene Kristallmasse wurde abgesogen, abgepreßt, mit wenig eiskaltem salzsäure-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 70.

haltigen Alkohol und zum Schluß mit einer Mischung von Alkohol und Äther gewaschen. Das so erhaltene Präparat war fast farblos, in heißem Alkohol sehr leicht und völlig löslich und nahezu chemisch rein. Seine Menge betrug 7,335 g, welche 78,5% des angewandten Glykocolls entsprechen.

Bei größerem Glykocollgehalt würde sich dieser Prozentsatz noch günstiger gestalten.

Aus der Mutterlauge konnten auch nach dem Eindampfen und erneuter Veresterung keine Kristalle mehr gewonnen werden.

---

51. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Hydrolyse des Oxyhämoglobins durch Salzsäure.

Zeitschrift für physiologische Chemie 36, 268 (1902).
(Eingegangen am 5. August.)

Von allen tierischen Proteïnstoffen ist das Oxyhämoglobin am leichtesten kristallisierbar und die schöne Ausbildung der Kristalle gewährt auch eine verhältnismäßig große Garantie, daß hier ein einheitliches chemisches Produkt vorliegt. Es schien deshalb von Interesse, die Hydrolyse des Oxyhämoglobins mit den neuen Methoden für die Isolierung der Aminosäuren zu studieren. Der Vergleich mit den Resultaten, die bei anderen Proteïden, wie Caseïn [1]), Seidenfibroïn [2]), Leim [3]) usw., erhalten worden waren, konnte zumal zur Aufklärung der Frage beitragen, ob die Zusammensetzung der Proteïnstoffe wirklich so kompliziert sei, wie man es nach der großen Zahl von Spaltprodukten bei jenen Materialien annehmen mußte. Allerdings ist das Oxyhämoglobin eine Verbindung des Farbstoffs Hämatin mit einem Eiweißstoff, für den F. N. Schulz [4]) den Namen Globin vorgeschlagen hat. Da aber der Farbstoff beim Erwärmen mit Salzsäure keine Spaltung erfährt, so darf man die bei der Hydrolyse des Oxyhämoglobins entstehenden Körper sämtlich als Zertrümmerungsprodukte des Globins betrachten. Von diesem Gesichtspunkte aus ist auch die Arbeit von Pröscher [5]) ausgeführt, welcher, wie es scheint, sich bisher allein mit der totalen Hydrolyse des Oxyhämoglobins beschäftigt hat. Da er sich aber mit der alten Methode für die Isolierung der Aminosäuren

---

[1]) Vgl. Emil Fischer, Über Hydrolyse des Caseïns durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 151 [1901]. (*S. 633.*)

[2]) Emil Fischer und Aladar Skita, Über das Fibroïn der Seide. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 177 [1901]. (*S. 654.*)

[3]) Emil Fischer, P. A. Levene und R. H. Aders, Über die Hydrolyse des Leims. Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 70 [1902]. (*S. 671.*)

[4]) Fr. N. Schulz, Der Eiweißkörper des Hämoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 449 [1898].

[5]) Friedr. Pröscher, Ein Beitrag zur Erforschung der Konstitution des Eiweißmoleküls. Zeitschr. f. physiol. Chem. **27**, 114 [1899].

begnügen mußte, so sind seine Resultate nicht allein lückenhaft, sondern auch zum Teil unsicher geblieben. Mit Bestimmtheit nachgewiesen ist durch den Versuch von Pröscher die Bildung von Tyrosin, Leucin und Asparaginsäure, während die Entstehung des Phenylalanins nur durch eine recht unsichere Geruchsprobe, und die der Glutaminsäure durch die Isolierung einer minimalen Quantität eines salzsauren Salzes, das nicht einmal analysiert wurde, signalisiert werden konnte.

Ganz anders gestaltet sich das Resultat der Hydrolyse, wenn zur Isolierung der Monoaminosäuren die fraktionierte Destillation der Ester verwendet wird. Mit Hilfe dieser Methode gelang es, in reinem Zustande Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin und α-Pyrrolidincarbonsäure zu isolieren, und auch annähernd das Mengenverhältnis derselben zu bestimmen. Mit demselben Grade von Genauigkeit war es möglich, die Abwesenheit von Glykocoll festzustellen. Rechnet man dazu noch das von Pröscher nachgewiesene Tyrosin, so ergibt sich bereits die Anwesenheit von sieben Monoaminosäuren im Molekül des Globins. Da außerdem noch Diaminosäuren vorhanden sind, wie Pröscher durch die Bildung eines Phosphorwolframsäureniederschlages nachgewiesen hat, und da auch das Vorhandensein von Oxyaminosäuren, auf die bisher nicht geprüft wurde, keineswegs unwahrscheinlich ist, so ergibt sich, daß in der Tat das Molekül des Globins eine ähnlich komplizierte Zusammensetzung haben muß, wie man es für die nicht kristallisierbaren Proteïnstoffe nach den hydrolytischen Spaltungsprodukten bisher annahm.

Experimenteller Teil.

Für die Hydrolyse wurden 900 g Pferdeoxyhämoglobin, welches nach der Methode von Zinoffsky[1]) dargestellt und zweimal umkristallisiert war, verwendet. Da der Wassergehalt 27,7% betrug, so entspricht die obige Menge 650,7 g trockenem Material. Dasselbe wurde mit 2700 g rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 übergossen, 12 Stunden stehen gelassen, bis klare Lösung eingetreten war, und dann 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nachdem die Lösung bei 14 mm Druck zum dicken Sirup eingedampft war, wurde die Masse mit 2700 g absolutem Alkohol übergossen, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und zum Schluß noch auf dem Wasserbade eine Stunde erhitzt. Auch hierbei erfolgte klare Lösung, welche mit der Veresterung der Aminosäuren Hand in Hand ging. Die Flüssigkeit war durch das Hämatin dunkelrot gefärbt. Um das bei der Veresterung

---

[1]) C. Zinoffsky, Über die Größe des Hämoglobinmoleküls. Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 16 [1886].

entstehende Wasser möglichst zu entfernen, wurde die Lösung abermals unter vermindertem Drucke verdampft, dann wieder mit 2700 g absolutem Alkohol übergossen und mit Salzsäuregas gesättigt. Durch diese wiederholte Operation wird erfahrungsgemäß die Bildung der Ester vervollständigt. Nach 12-stündigem Stehen teilt man zweckmäßig die Flüssigkeit wegen der leichteren späteren Verarbeitung in vier Portionen, verdampft jede unter stark vermindertem Druck zum Sirup, und isoliert dann die Ester durch Zusatz von Äther, Kaliumcarbonat und sehr konzentrierter Natronlauge unter sehr sorgfältiger Kühlung genau in der Art, wie es beim Caseïn[1]) und Leim beschrieben wurde.

Die fraktionierte Destillation der Ester wurde zuerst unter einem Drucke von 12 mm aus dem Wasserbade und nachher bei einem Drucke von 0,2—0,5 mm anfangs wieder aus dem Wasserbade und später aus dem Ölbade ausgeführt, wobei folgende Fraktionen resultierten:

1. Fraktion	bis 40°	(Temp. d. Dämpfe gemessen)	bei 12 mm	Druck	26,0 g
2. „	40—60°	(„ „ „ „)	„ 12 „	„	57,5 „
3. „	bis 100°	(„ des Wasserbades)	„ 0,2[2]) „	„	180,0 „
4. „	100—130°	(„ „ Ölbades)	„ 0,5 „	„	46,2 „
5. „	130—160°	(„ „ „)	„ 0,5 „	„	52,5 „

Fraktion 3 wurde nochmals bei 12 mm Druck in folgende beide Teile geschieden:

3 a.	60—80°	(Temp. der Dämpfe gemessen)	bei 12 mm	Druck	95,0 g
3 b.	80—100°	(„ „ „ „)	„ 12 „	„	84,2 „

Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen geschah im wesentlichen wie beim Caseïn und Leim.

Im besonderen ist dazu folgendes zu bemerken:

Fraktion 1 (bis 40°).

Dieselbe enthielt noch viel Alkohol und etwas Äther. Sie wurde zur Verseifung der Ester mit Salzsäure eingedampft. Von dem festen Rückstande dienten 2 g zur Prüfung auf Glykocoll. Sie wurden zu diesem Zwecke mit Alkohol und Salzsäure verestert und nach Einimpfen eines Kriställchens von salzsaurem Glykocollester 24 Stunden bei 0° gehalten. Das Resultat war negativ.

Der Hauptbestandteil der Aminosäuren war Alanin, welches nach der Entfernung der Salzsäure mit Bleioxyd und Fällung des gelösten

---

[1]) l. c.

[2]) Für die Destillation unter diesem geringen Drucke diente der in den Berichten der deutschen chemischen Gesellschaft **35**, 2158 (1902) beschriebene Vakuumapparat.

Bleies im Filtrate mit Schwefelwasserstoff durch Kristallisation aus Wasser in reinem Zustande abgeschieden wurde. Die Menge betrug 4 g. Der Schmelzpunkt war 294° (unkorr.).

0,1467 g Substanz gaben 0,2178 g CO_2 und 0,1040 g H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:	Gefunden:
40,45% C; 7,87% H	40,49% C; 7,94% H.

Fraktion 2 (40—60°).

Nachdem eine Probe auf Glykocoll auch hier negativ ausgefallen war, wurden die Ester durch Kochen mit der 5-fachen Menge Wasser verseift, und die Aminosäuren durch Kristallisation aus Wasser getrennt. Isoliert wurden auf diese Weise Alanin und Leucin. Die Menge des ersteren betrug 10,5 g. Schmelzpunkt 293° (unkorr.).

0,2032 g Substanz gaben 0,3024 g CO_2=40,58% C u. 0,1465 g H_2O=8,08% H.

Für die optische Bestimmung diente das salzsaure Salz, für welches gefunden wurde $[\alpha]_D^{20°} = +8,7$. Es handelte sich mithin um das gewöhnliche *d*-Alanin, dem aber eine kleine Menge des Racemkörpers beigemengt war.

Leucin wurden erhalten 19,7 g.

Fraktion 3a (60—80°).

Nach der Verseifung mit Wasser wurden die Aminosäuren durch Kristallisation in der bekannten Weise getrennt und erhalten 60,0 g Leucin, 4,2 g Alanin und 7,5 g α-Pyrrolidincarbonsäure.

Die Analysen des Leucins und seines Kupfersalzes gaben folgende Zahlen:

0,1511 g Substanz gaben 0,3047 g CO_2 und 0,1348 g H_2O.

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$:	Gefunden:
54,96% C und 9,92% H	54,99% C und 10,0% H.

0,1875 g Kupfersalz gaben 0,0459 g CuO.

Berechnet für $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$:	Gefunden:
19,60% Cu	19,63% Cu.

Der Schmelzpunkt wurde im geschlossenen Kapillarrohre bei 298° (unkorr.) gefunden.

Die optische Untersuchung der salzsauren Lösung ergab, daß es sich um ein Gemisch von *l*-Leucin und racemischem Leucin handelte.

Die Pyrrolidincarbonsäure war zum größten Teil racemisch. Zur Abtrennung der aktiven Säure diente, wie früher, das Kupfersalz. Analysiert wurde nur die racemische Verbindung und ihr Kupfersalz.

0,2011 g Substanz gaben 0,3836 g CO_2 und 0,1417 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_9NO_2$:	Gefunden:
52,18% C und 7,83% H	52,02% C und 7,89% H.

0,2619 g lufttrocknes Kupfersalz gaben 0,0635 g CuO.

Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$:	Gefunden:
19,36% Cu	19,32% Cu.

0,5118 g Substanz verloren bei 120° 0,0573 g H_2O.

Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O$:	Gefunden:
10,99% H_2O	11,19% H_2O.

Der Schmelzpunkt lag bei 207° (unkorr.).

Fraktion 3b (80—100°).

Sie bestand im wesentlichen aus denselben Produkten, wie die vorhergehende Fraktion. Isoliert wurden 50,5 g Leucin und 2,0 g α-Pyrrolidincarbonsäure.

Fraktion 4 (100—130°).

Sie enthielt die Ester von Phenylalanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure. Für die Abtrennung des ersteren diente die früher angewandte Methode mit folgender Abänderung.

Das Estergemisch wird mit der 5-fachen Menge Wasser versetzt, wobei fast vollständige Lösung eintritt, weil der Phenylalaninester durch die beiden anderen Ester in Wasser löslich gemacht wird. Man schüttelt dann die Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Äther. Dabei geht der Phenylalaninester so gut wie vollständig, die beiden anderen Ester dagegen nur in relativ kleiner Menge in den Äther über. Um diese letzteren zu entfernen, wird die abgetrennte ätherische Lösung dreimal mit dem gleichen Volumen Wasser ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung hinterläßt beim Verdampfen den Phenylalaninester frei von Glutaminsäure- und Asparaginsäureester und in nahezu quantitativer Menge. Zur Isolierung des Phenylalanins ist es am bequemsten, den Ester in starker Salzsäure zu lösen, auf dem Wasserbade abzudampfen und das zurückbleibende Hydrochlorat aus warmer starker Salzsäure umzukristallisieren. Verdampft man das so isolierte Hydrochlorat mit überschüssigem Ammoniak auf dem Wasserbade, so bleibt ein Gemenge von Chlorammonium und Phenylalanin zurück, welches leicht durch kaltes Wasser zu trennen ist. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser gibt das Phenylalanin sofort die richtigen Analysenzahlen:

0,2023 g Substanz gaben 0,4868 g CO_2 und 0,1219 g H_2O.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_2$:	Gefunden:
65,45% C und 6,66% H	65,62% C und 6,75% H.

Der Zersetzungspunkt lag bei 281° (unkorr.).

Dieses Verfahren ist die bei weitem bequemste Methode, Phenylalanin zu erkennen, und gestattet, auch noch recht geringe Mengen dieser Aminosäure aus komplizierten Gemischen zu isolieren.

Erhalten wurden aus dieser Fraktion 8,5 g Phenylalanin.

Die vereinigten wässerigen Lösungen, welche den Asparaginsäure- und Glutaminsäureester enthielten, wurden mit einer konzentrierten Lösung von Barythydrat im Überschusse zwei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt und zur Kristallisation des asparaginsauren Baryts mehrere Tage bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt. Aus dem Filtrate des Barytsalzes wurde zuerst der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ gefällt, dann eingedampft und aus der konzentrierten Lösung die Glutaminsäure durch Einleiten von Salzsäuregas abgeschieden. Die aus dem umkristallisierten Hydrochlorat isolierte Glutaminsäure betrug 6,9 g.

0,2005 g Substanz gaben 0,2991 g CO_2 und 0,1080 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_9NO_4$:	Gefunden:
40,81% C und 6,12% H	40,68% C und 6,04% H.

Die Asparaginsäure findet sich zum Teil im unlöslichen Barytsalz, zum Teil in der salzsauren Mutterlauge, die nach der Ausfällung der Glutaminsäure bleibt. Aus dem Barytsalz gewinnt man sie durch einfache Zersetzung mit Schwefelsäure. Dagegen muß aus der salzsauren Mutterlauge die Mineralsäure durch Kochen mit Bleioxyd entfernt und das gelöste Blei aus dem Filtrate mit Schwefelwasserstoff gefällt werden. Die gereinigte Asparaginsäure gab folgende Zahlen:

0,2101 g Substanz gaben 0,2787 g CO_2 und 0,0998 g H_2O.

Berechnet für $C_4H_7NO_4$:	Gefunden:
36,09% C und 5,26% H	36,18% C und 5,33% H.

Fraktion 5 (130—160°).

Sie wurde genau so verarbeitet, wie die vorhergehende Fraktion. Sie gab noch 13,5 g Phenylalanin und etwas Asparaginsäure, während Glutaminsäure hier nicht isoliert werden konnte. Aus Fraktion 4 und 5 zusammen wurden 21,4 g Asparaginsäure erhalten.

Die Gesamtmenge der isolierten Monoaminosäuren betrug für 650,7 g trockenes Oxyhämoglobin:

	Berechnet:	
	in Gramm	in Prozent
Alanin	18,7	2,87
Leucin	130,2	20,01

	Berechnet: in Gramm	Berechnet: in Prozent
α-Pyrrolidincarbonsäure . .	9,5	1,46
Phenylalanin	22,0	3,38
Glutaminsäure	6,9	1,06
Asparaginsäure	21,4	3,29
In Summa . . .	208,7 g	32,07%

Nimmt man mit F. N. Schulz[1]) an, daß die Menge des Hämatins 4,2% des Oxyhämoglobins des Pferdes beträgt, so berechnen sich für Globin die obigen Monoaminosäuren in folgender Art:

Alanin	2,99%
Leucin	20,88%
α-Pyrrolidincarbonsäure	1,52%
Phenylalanin	3,53%
Glutaminsäure	1,11%
Asparaginsäure	3,43%
In Summa . .	33,46%

Es verdient noch bemerkt zu werden, daß diese Zahlen nur Minimalwerte sind, da nicht allein bei der Isolierung der Ester, sondern auch bei der Trennung der Aminosäuren durch Kristallisation Verluste unvermeidlich sind. Wir schätzen den gesamten Verlust auf etwa $^1/_3$ der Menge der Aminosäuren, die bei der Hydrolyse in Wirklichkeit entstehen.

Aus obigen Resultaten ergibt sich in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen bei anderen Proteïnstoffen, daß außer α-Pyrrolidincarbonsäure das Alanin und Phenylalanin regelmäßige Bestandteile des Proteïnmoleküls sind. Ihnen begegnet man in der Tat häufiger als dem Tyrosin und Glykocoll, die früher als besonders verbreitete Aminosäuren betrachtet wurden. Sie werden an biologischer Bedeutung nur übertroffen durch das Leucin, welches ebenso regelmäßig in den Proteïnstoffen vorhanden ist, aber an Menge in der Regel überwiegt.

Vielleicht erklärt sich das gemeinsame Vorkommen von Leucin und Alanin aus der Ähnlichkeit ihrer Zusammensetzung mit den Kohlenhydraten, denn das erstere kann man sich entstanden denken aus einer Hexose durch Zutritt von Ammoniak und partielle Reduktion, während das Alanin das stickstoffhaltige Analogon der Milchsäure ist, die bekanntlich leicht aus den Hexosen durch Alkali oder Fermente entsteht. Will man diese Betrachtung auf Glutaminsäure und Aspara-

[1]) l. c. S. 269. (*S. 695.*)

ginsäure ausdehnen, so liegt der Gedanke am nächsten, daß sie aus dem Leucin durch nachträgliche Oxydation gebildet werden.

Größere Schwierigkeiten macht die Ableitung des Phenylalanins, da die Bildung des Benzolkerns aus Kohlenhydratgruppen kompliziertere chemische Vorgänge voraussetzt. Anders liegen die Verhältnisse wieder bei der α-Pyrrolidincarbonsäure, deren chemische Verwandtschaft mit dem Ornithin und Arginin unverkennbar ist, und deren Auftreten unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Proteïne auch in quantitativer Beziehung mit dem Vorhandensein der Diaminosäuren nach den bisherigen Beobachtungen zusammenfällt. Derartige Beziehungen weiter zu verfolgen, wird gewiß zu den künftigen chemischen Aufgaben der Biologie gehören.

Diese Untersuchung soll auf die Diaminosäuren und Oxyaminosäuren ausgedehnt werden.

---

52. Emil Fischer und Theodor Dörpinghaus: Hydrolyse des Horns.

Zeitschrift für physiologische Chemie **36**, 462 (1902).
(Eingegangen am 31. August.)

Bei der Hydrolyse des Horns sind bisher gefunden worden: Tyrosin und Leucin[1]), Asparaginsäure[2]) und Glutaminsäure[3]), Arginin[4]), Lysin[5]) und endlich Cystin[6]). Nach den Erfahrungen bei anderen Proteïnstoffen war indessen zu erwarten, daß noch weitere Spaltungsprodukte vorhanden seien. Wir hielten deshalb eine Nachprüfung der älteren Untersuchungen mit den neueren Hilfsmitteln für wünschenswert, und es ist uns durch die Estermethode in der Tat gelungen, noch folgende 6 Monoaminosäuren: Glykocoll, Alanin, α-Aminovaleriansäure, α-Pyrrolidincarbonsäure, Serin und Phenylalanin aus dem Horn zu isolieren.

Besondere Beachtung verdient unter diesen das Serin, welches Cramer bekanntlich zuerst aus dem Seidenleim erhielt, und welches seitdem auch unter den Spaltungsprodukten des Seidenfibroïns gefunden wurde[7]).

Da die Hornsubstanz von diesen beiden Produkten in ihrer Zusammensetzung erheblich abweicht, so deuten die folgenden Beobachtungen darauf hin, daß Serin ein verbreiteter Bestandteil der Proteïnstoffe ist, und wir haben die Überzeugung, daß es nur infolge seiner schwierigen Erkennung bisher so selten gefunden wurde.

Auf die Verbreitung der α-Pyrrolidincarbonsäure, ferner des Alanins und Phenylalanins wurde bereits früher wiederholt hingewiesen.

Mit der Aminovaleriansäure scheint es ähnlich zu stehen, aber ihre Isolierung bietet so große Schwierigkeiten, daß sie nach der Auffindung im Caseïn hier zum ersten Male wieder als hydrolytisches

---

[1]) Hinterberger, Ann. d. Chem. **71**, 70.
Schwanert, Ann. d. Chem. **102**, 222.
[2]) Kreußler und Hinterberger, Journ. f. prakt. Chem. **107**, 222 u. 240.
[3]) Horbaczewski, Sitzungsberichte d. kais. Akad. **80**, 101.
[4]) Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**, 186.
[5]) Hedin, Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**, 297.
[6]) Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 595 u. **34**, 207.
[7]) E. Fischer u. A. Skita, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 221. (*S. 686.*)

Spaltungsprodukt der Proteïne im reinen Zustand abgeschieden wurde. Ihre Menge ist hier relativ groß, denn sie beträgt nach unserer Schätzung 4—5% der Hornsubstanz; leider ist aber die Trennung vom Leucin so schwer, daß die Darstellung des reinen Präparats eine sehr mühsame Arbeit erfordert und mit großen Verlusten verbunden ist.

Für die Untersuchung diente Horn von Rindern aus den Donauländern, welches in Form feiner Abfallspäne von einer Berliner Knopffabrik bezogen wurde. Es verlor bei 4-stündigem Trocknen im Toluolbade 12,7% Wasser und wenn das Trocknen nach vorhergegangenem 24-stündigen Auslaugen mit 5-prozentiger Salzsäure erfolgte, 17,3%.

Auf eine Reindarstellung des Keratins nach dem Verfahren von Kühne und Chittenden[1]) haben wir verzichtet, da auch das so gewonnene Präparat kaum als ein einheitlicher Körper betrachtet werden kann.

Für die Hydrolyse wurden 1 kg Hornspäne mit 4 kg Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 übergossen. Nach 4-stündigem Erhitzen auf dem Wasserbade war der allergrößte Teil gelöst und nun wurde die Mischung 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das völlige Verschwinden der Biuretreaktion zeigte die Beendigung der Hydrolyse an.

Die tiefbraune Lösung wurde zunächst von einem Rückstand, der größtenteils aus Salmiak und Natronsalzen bestand, abfiltriert und bei stark vermindertem Druck zum dicken Sirup eingedampft, dann noch warm mit 3 L absolutem Alkohol übergossen und durch Einleiten von Salzsäuregas ohne Abkühlung verestert. Bei dieser Operation entstand wiederum eine klare tiefbraune Lösung. Um die Veresterung zu vervollständigen, ist es ratsam, nach zwölfstündigem Stehen unter vermindertem Druck einzudampfen und den Rückstand von neuem mit der gleichen Menge Alkohol und Salzsäuregas zu behandeln. Nach 24-stündigem Stehen wird wiederum unter vermindertem Druck aus einem Wasserbade, dessen Temperatur 45° nicht überschreiten soll, verdampft und der Rückstand in der mehrfach beschriebenen Weise[2]) mit Äther, Kaliumcarbonat und konzentrierter Alkalilösung auf die freien Ester der Aminosäuren verarbeitet. Die ätherische Lösung derselben ist zuerst dunkelbraun gefärbt, wird aber beim Trocknen mit Natriumsulfat hellgelb. Beim Verdunsten des Äthers auf dem Wasserbade bleibt ein gelbbraunes Öl zurück, welches die Ester der Aminosäuren und außerdem eine nicht unerhebliche Menge von schwefelhaltigen Körpern enthält. Die letzteren erschweren infolge ihrer leichten

---

[1]) Zeitschr. f. Biologie **26**, 291.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 153. (*S. 635.*)

Zersetzlichkeit die Destillation auch bei 0,3 mm Druck so sehr, daß es ratsam ist, sie durch Vermischen mit Petroläther von den leichtflüchtigen Aminoestern zu trennen. Zu diesem Zweck wurde das obige Gemisch der Ester mit 2 kg Petroläther (bis 38° siedend) geschüttelt, wobei ein dunkelbraunes Öl ausfiel, während die darüber stehende Lösung hellgelb gefärbt war.

Mit Ausnahme des Serins findet sich nun der größere Teil der Aminosäureester in der Petrolätherlösung, während die schwefelhaltigen Produkte mit dem Serinester und dem Rest der Aminoester in dem dunklen Öl enthalten sind.

Um die getrennte Verarbeitung dieser beiden Teile schildern zu können, bezeichnen wir sie als A und B.

A)

Zunächst wurde der Petroläther auf dem Wasserbade abdestilliert und der Rückstand erst unter 10 mm Druck aus einem bis 70° erwärmten Bade abdestilliert (Fraktion 1), dann die Destillation unter 0,2—0,4 mm Druck fortgesetzt und dabei folgende Fraktionen erhalten:

2.	50—115°	(Temperatur des Bades)	195 g
3.	115—140°	„ „ „	45 „
4.	140—155°	„ „ „	15 „
5.	155—195°	„ „ „	27 „
			282 g

Dazu kommen noch 39 g Ester, welche aus Fraktion 1, die noch viel Äther, Alkohol und Petroläther enthielt, durch wiederholte, fraktionierte Destillation erhalten wurden, so daß die Ausbeute an Estern im ganzen 321 g betrug. Im Gegensatz zu den vier ersten Fraktionen erstarrte die fünfte Fraktion zum größten Teil in der Vorlage.

Nicht flüchtige Produkte sind in dem Petroläther kaum gelöst, denn der Destillationsrückstand betrug nur wenige Gramm und dieses Produkt war aller Wahrscheinlichkeit nach sekundär aus den Estern entstanden.

B)

Anders verhielt sich das in Petroläther unlösliche Öl. Bei seiner Destillation, welche in gleicher Weise ausgeführt wurde, blieb ein tiefschwarzer, glänzender, schwefelhaltiger Rückstand, der beim Erkalten sehr hart und spröde wurde, im Gewichte von 110 g zurück. Außerdem resultierten folgende Fraktionen:

1.	bis 70°	(Temperatur des Bades bei	10 mm)	34 g
2.	60—110°	„ „ „ „	0,2—0,4 „	50 „

3. 110—135°	(Temperatur des Bades bei 0,2—0,4 mm)	25 g
4. 135—155°	„ „ „ „ 0,2—0,4 „	30 „
5. 155—185°	„ „ „ „ 0,2—0,4 „	33 „
		172 g

Die Gesamtmenge der Ester der Monoaminosäuren mit Ausnahme des Tyrosins betrug mithin 493 g, d. i. 56,5% der Trockensubstanz oder 59,5% des mit Salzsäure ausgelaugten Horns.

Die beiden ersten Fraktionen von A und B wurden nochmals unter 10 mm Druck fraktioniert.

Die Verseifung der Ester geschah wie früher bei den unter 85° siedenden (Temperatur des Dampfes) Präparaten durch Kochen mit Wasser am Rückflußkühler und bei den höher siedenden durch Erwärmen mit überschüssigem Barytwasser auf dem Wasserbade. Im letzteren Falle blieb die Lösung längere Zeit zur möglichst vollständigen Abscheidung des asparaginsauren Baryts stehen, wurde dann filtriert und nach dem genauen Ausfällen des Baryts zur Gewinnung der in Lösung befindlichen Aminosäuren im Vakuum zur Trockne verdampft.

Zur Abscheidung des Phenylalanins und Serins war noch eine besondere Behandlung der über 85° siedenden Ester vor der Verseifung nötig, welche später genauer beschrieben wird.

Rechnet man diese beiden Aminosäuren und das Tyrosin ab, so war die Menge der aus den beiden Esterfraktionen erhaltenen Aminosäuren folgende:

A)

1.	bis 40°	(Temperatur des Dampfes)	5,5 g
2.	40— 55°	„ „ „	4,0 „
3.	55— 80°	„ „ „	62,0 „
4.	80— 85°	„ „ „	111,0 „
5.	85—110°	„ „ „	3,0 „
6.	110—140°	(Temperatur des Bades)	20,0 „
7.	140—155°	„ „ „	10,0 „
8.	155—195°	„ „ „	16,0 „
			231,5 g

B)

1.	bis 40°	(Temperatur des Dampfes)	1,5 g
2.	40— 55°	„ „ „	5,5 „
3.	55— 80°	„ „ „	10,0 „
4.	80— 85°	„ „ „	25,0 „
5.	85—110°	„ „ „	22,0 „
6.	110—135°	(Temperatur des Bades)	12,0 „

7. 135—155⁰ (Temperatur des Bades) 18,0 g
8. 155—185⁰ ,, ,, ,, 10,0 ,,

104,0 g

Aus Fraktion 6 und 7 dieses Teils (B) wurden 7 beziehungsweise 8 g unlöslichen Barytsalzes erhalten, das in obigen Zahlen nicht einbegriffen ist.

Schwefelhaltige Produkte waren in den über 110⁰ siedenden Fraktionen enthalten, sie sind aber frei von Stickstoff und befinden sich in dem durch Äther abgeschiedenen Phenylalaninester. Cystin und ähnliche Produkte bleiben bei der Anwendung der Estermethode entweder in der alkalischen Lauge oder in dem nicht flüchtigen Teil des ätherischen Auszuges. Ferner entstand bei der Destillation eine erhebliche Menge flüchtiger, schwefelhaltiger Produkte, vor allem Schwefelammonium, welche sich in der durch flüssige Luft gekühlten zweiten Vorlage zusammen mit etwa 25 ccm Alkohol kondensierten.

Der Nachweis des Glykocolls, der gewöhnlich durch Abscheidung des in Alkohol unlöslichen salzsauren Esters geschieht, ließ sich hier infolge eines Zufalls sehr leicht führen.

Die unter 40⁰ siedende Fraktion schied nämlich schon nach kurzem Stehen Kristalle ab, die nach 6 Stunden abfiltriert wurden und deren Menge verhältnismäßig groß war (2,5 g).

Nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser wurden sie als Glycinanhydrid erkannt. Sie schmolzen im geschlossenen Rohr bei 305⁰ unter Zersetzung und gaben folgende Zahlen:

0,1201 g Substanz gaben 0,1856 CO_2 und 0,0585 H_2O.
0,1452 ,, ,, ,, 31 ccm N bei 20,5⁰ und 759 mm.

$C_4H_6N_2O_2$ berechnet: 42,11 % C, 5,26 % H, 24,36 % N;
gefunden: 42,14 % C, 5,41 % H, 24,32 % N.

Andere Mengen von Glykocoll waren in den höheren Fraktionen enthalten, wurden aber nicht isoliert.

Fraktion 40—55⁰.

Die Menge der aus A und B gewonnenen Aminosäuren betrug 9,5 g und bestand zum größeren Teil aus Alanin, enthielt aber auch kleinere Mengen der Homologen. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Wasser oder verdünntem Alkohol wurden 3 g reines *d*-Alanin isoliert.

0,1724 g Substanz gaben 0,2548 g CO_2 und 0,1233 g H_2O.
0,1666 ,, ,, ,, 22,9 ccm N bei 22⁰ und 760 mm.

$C_3H_7NO_2$ berechnet: 40,45 % C, 7,86 % H, 15,73 % N:
gefunden: 40,31 % C, 7,95 % H, 15,57 % N.

Die optische Bestimmung des Hydrochlorats ergab:

0,5812 g Substanz in 6,5499 g Wasser. Mithin 8,15% Gehalt. Spezifisches Gewicht 1,014. Drehung im Dezimeterrohr bei Natriumlicht 0,70° nach rechts, mithin

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +8,5,$$

während das reine *d*-Alanin +10,3 hat. Das Präparat war also größtenteils *d*-Alanin mit einer kleinen Beimengung von Racemkörper.

Zur völligen Identifizierung wurde es durch Erhitzen mit überschüssigem Barytwasser auf 180° völlig racemisiert[1]) und in den Benzoylkörper verwandelt[2]). Letzterer schmolz bei 162° und hatte die Zusammensetzung $C_{10}H_{11}NO_3$.

0,1327 g Substanz gaben 0,3018 CO_2 und 0,0679 H_2O.

$C_{10}H_{11}NO_3$ berechnet: 62,17% C, 5,70% H;

gefunden: 62,03% C, 5,65% H.

Fraktion 55—80°.

Die Aminosäure, deren Gesamtmenge aus A und B 72 g betrug, war gelb gefärbt. Sie enthielt eine erhebliche Menge von α-Pyrrolidincarbonsäure. Um diese abzuscheiden, wurde das gepulverte Produkt zweimal mit der 10-fachen Menge absoluten Alkohols ausgekocht, wobei 16 g in Lösung gingen. Der nicht gelöste Teil war ein Gemisch von Aminovaleriansäure und Leucin, deren Trennung noch dadurch erschwert wurde, daß beide Säuren partiell racemisiert waren.

Zunächst wurden 15 g des Gemisches in 300 ccm heißem Wasser gelöst und die erkaltete Flüssigkeit 24 Stunden der Kristallisation überlassen. Hierbei fiel eine verhältnismäßig geringe Menge Leucin aus. Das Filtrat wurde mit weiteren 400 ccm Wasser versetzt und mit überschüssigem gefällten Kupferoxyd ½ Stunde gekocht. Die heiß filtrierte Lösung schied beim Erkalten 1,3 g Leucinkupfer ab.

Die durch Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreite Lösung wurde fraktioniert kristallisiert, wobei die leichtlöslichen Teile durch Zusatz von Alkohol abgeschieden wurden, dann einer erneuten systematischen Kristallisation unterworfen, bis schließlich die leicht löslichen Partien die Zusammensetzung der Aminovaleriansäure zeigten.

So gelang es, allerdings mit vieler Mühe, 3 g eines Präparats zu isolieren, welches, abgesehen von der gutstimmenden Analyse, auch in

---

[1]) Da Glasröhren von dem Barytwasser bei dieser Temperatur zu stark angegriffen werden, so benützten wir zu diesen und ähnlichen Operationen Porzellanbecher, die mit der Flüssigkeit gefüllt in einem Autoklaven von Kupfer oder Eisen erhitzt werden.

[2]) E. Fischer, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **32**, 2454. (*S. 91.*)

seinen äußeren Eigenschaften den Eindruck einer einheitlichen Substanz machte.

0,1917 g Substanz gaben 0,3602 g CO_2 und 0,1608 g H_2O.
0,2129 „ „ „ 22 ccm N bei 19,5° und 755 mm.
$C_5H_{11}NO_2$ berechnet: 51,28 % C, 9,40 % H, 11,95 % N;
gefunden: 51,23 % C, 9,33 % H, 11,77 % N.

0,3651 g Substanz in 3,9354 g 20-prozentiger Salzsäure gelöst. Mithin 8,49% Gehalt. Spezifisches Gewicht 1,09. Drehung im 1-Dezimeterrohr 2,4° nach rechts. Das entspricht

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +25,9.$$

Der Wert stimmt ungefähr überein mit den Zahlen, welche der eine von uns für die Aminovaleriansäure aus Caseïn fand (27,1) und mit denjenigen, die E. Schulze und E. Winterberger[1]) an der aus Keimlingen von Lupinen erhaltenen Säure beobachteten (+28,2 und +27,9).

Auf die geringen Unterschiede ist kein Wert zu legen, da, wie schon gesagt, bei der Hydrolyse von Proteïnsubstanzen durch starke Salzsäure stets ein Teil der Aminosäuren racemisiert wird und die Isolierung der reinen aktiven Säure durch Kristallisation kaum möglich ist.

Wir halten es deshalb für wahrscheinlich, daß die Aminovaleriansäure aus Caseïn, Horn und Lupinen die gleiche ist.

Um ein Urteil über die Struktur dieser Säure zu gewinnen, haben wir das Präparat aus Horn durch 18-stündiges Erhitzen mit überschüssigem Barythydrat auf 180° racemisiert und nach dem Ausfällen des Baryts die Aminosäure in den Phenylcyanatkörper und dessen Anhydrid verwandelt.

Das erste schmolz unter Zersetzung bei 162,5° (korr.) und der Schmelzpunkt des letzteren lag bei 123° (korr.).

Die Analyse des Anhydrids gab folgende Zahlen:

0,1998 g Substanz gaben 0,4825 g CO_2 und 0,1179 g H_2O.
$C_{12}H_{14}N_2O_2$ berechnet: 66,05 % C, 6,42 % H;
gefunden: 65,83 % C, 6,55 % H.

Die beiden Schmelzpunkte sind allerdings etwas verschieden von den Werten, die früher für die entsprechenden Derivate der Aminovaleriansäure aus Caseïn gefunden wurden[2]). Wir glauben jedoch, daß die jetzt untersuchte Säure reiner war, da uns eine erheblich größere

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 300.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 160. (*S. 640.*)

Menge Material zur Verfügung stand. Um so mehr Interesse verdient die Übereinstimmung der jetzt beobachteten Schmelzpunkte mit denjenigen, welche M. Slimmer im hiesigen Laboratorium für die beiden Phenylcyanatverbindungen der synthetischen α-Aminoisovaleriansäure fand[1]).

Wir halten es daher für recht wahrscheinlich, daß die im Horn, ferner, wie oben erwähnt, im Caseïn und in den Keimlingen von Lupinus beobachtete Aminovaleriansäure die aktive α-Aminoisovaleriansäure

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!CH.CH(NH_2).COOH$$

ist.

Fraktion 80—85°.

Die Gesamtmenge der Aminosäuren aus A und B betrug 136 g. Sie wurde zuerst durch Kristallisation aus heißem Wasser in 4 Fraktionen zerlegt und zwar aus A 3 Fraktionen zu 50, 25 und 26 g und aus B 1 Fraktion zu 25 g. Jede dieser Fraktionen wurde zur Isolierung der α-Pyrrolidincarbonsäure, welche sich jedoch hauptsächlich in der dritten Fraktion von A befand, mit der 10-fachen Menge absoluten Alkohols ausgekocht und der alkoholische Auszug mit dem aus der vorigen Fraktion gewonnenen vereinigt.

Beim Einengen der alkoholischen Lösung fiel zunächst eine kleine Menge (5 g) gewöhnlicher Aminosäuren aus. Um diese möglichst vollständig zu entfernen, verdampft man zur Trockne, kocht den Rückstand wieder mit Alkohol aus, verdampft das Filtrat abermals und wiederholt die Lösung in Alkohol. So wurden schließlich 30,5 g α-Pyrrolidincarbonsäure gewonnen, welche fast frei von gewöhnlichen Säuren war.

Für die Trennung der aktiven und der racemischen Verbindung dienten wie früher die Kupfersalze, von denen das aktive Salz in Alkohol leicht löslich ist, während das racemische ungelöst zurückbleibt.

Das racemische pyrrolidincarbonsaure Kupfer, welches aus Wasser in schön ausgebildeten blauen Prismen kristallisierte, zeigte die Zusammensetzung:

$$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2\,H_2O.$$

0,3121 g Substanz verlor bei 120° 0,0340 g H_2O.

Berechnet: 10,99% H_2O;
Gefunden: 10,90% H_2O.

0,2531 der wasserfreien Substanz gaben 0,0687 CuO.

Berechnet: 21,81% Cu;
Gefunden: 21,66% Cu.

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 403. (*S. 161.*)

Die racemische Säure schmolz unter Zersetzung bei 203—204°. Ihre Gesamtmenge betrug 11 g.

Zur Identifizierung der aktiven Säure diente das Anhydrid der Phenylcyanatverbindung. Es schmolz bei 143° und gab folgende Zahlen:

0,1617 g Substanz gaben 0,3957 g CO_2 und 0,0845 g H_2O.
0,1557 „ „ „ 17,5 g bei 19,5° und 758 mm.

$C_{12}H_{12}N_2O_2$ berechnet: 66,67% C, 5,57% H, 12,96% N;
gefunden: 66,74% C, 5,82% H, 12,92% N.

Zur Bestimmung der optischen Drehung wurden 0,3956 g in 4,4836 g 20-prozentiger Salzsäure gelöst. Mithin Gehalt 8,1%, spezifisches Gewicht 1,120, Drehung 4,33° nach links. Also

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = -47,60^\circ.$$

Der Wert stimmt mit dem früher für das Präparat aus Caseïn gefundenen gut überein.

Die in Alkohol unlöslichen Aminosäuren dieser Fraktion bestanden zum größten Teil aus Leucin, welches bekanntlich durch Kristallisation aus heißem Wasser wegen seiner geringen Löslichkeit gut gereinigt werden kann. Es gelang daher leicht, 70 g ganz reines Leucin darzustellen.

Die optische Drehung des zuerst auskristallisierten Produkts zeigte eine geringe Differenz gegen diejenige der zweiten Fraktion.

a) 1,0485 g Leucin in 21,0061 g Salzsäure von 20% gelöst; mithin Prozentgehalt 4,75, spezifisches Gewicht 1,11, Drehung im 2-Dezimeterrohr 1,96 nach rechts.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +18,5^\circ.$$

b) 1,1291 g Leucin in 20,2315 g Salzsäure von 20% gelöst; mithin Prozentgehalt 5,28, spezifisches Gewicht 1,12, Drehung im 2-Dezimeterrohr 2,09 nach rechts

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +17,67^\circ.$$

Die Analyse gab folgende Werte:

0,2329 g Substanz gaben 0,4686 g CO_2 und 0,2099 g H_2O.
0,3195 „ „ „ 29,6 ccm N bei 21° und 761 mm.

$C_6H_{13}NO_2$ berechnet: 54,96% C, 9,92% H, 10,69% N;
gefunden: 54,88% C, 10,02% H, 10,58% N.

Die höher siedenden Fraktionen von A und B sind getrennt untersucht worden.

Fraktion 85—110° (A).

Die Fraktion war sehr klein (3 g) und bestand im wesentlichen aus Leucinester.

Fraktion 85—110° (B).

Sie enthielt Ester von Leucin, Asparaginsäure, Serin und einer bisher noch unbekannten Aminosäure. Ihre Verarbeitung war wesentlich auf die Isolierung des Serins gerichtet. Zu dem Zwecke wurden die 22 g Ester dieser Fraktion mit 5 ccm Wasser versetzt und mit dem 8-fachen Volumen Petroläther ausgeschüttelt, wodurch Leucin und Asparaginsäure entfernt wurden. Die wässerige Schicht enthielt den größten Teil der übrigen Bestandteile. Sie wurde zunächst mit Barytwasser verseift und nach dem genauen Ausfällen des Baryts unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit dem 6-fachen Volumen Alkohol ausgekocht. Hierbei geht die obenerwähnte, unbekannte Substanz in Lösung; sie bleibt beim Verdampfen des Alkohols als dicker Sirup zurück und konnte bisher leider nicht in eine analysierbare Form gebracht werden. Das Kupfersalz dieser Säure, welches ebenfalls nicht kristallisiert, ist zum Unterschied vom aktiven α-pyrrolidincarbonsauren Kupfer unlöslich in Alkohol.

Der im Alkohol unlösliche Teil enthielt das Serin. Er wurde in wenig kaltem Wasser gelöst, von einem geringen Rückstand abfiltriert, dann mit Tierkohle gekocht und nach dem starken Einengen der Kristallisation im Exsikkator über Schwefelsäure überlassen. Die Menge der erhaltenen Kristalle betrug 4,5 g. Nach einmaligem Umlösen aus Wasser war das Präparat rein.

0,2375 g gaben 0,2963 g CO_2 und 0,1440 g H_2O.
0,2120 „ „ 23,8 ccm N bei 14° und 758 mm.

$C_3H_7NO_3$ berechnet: 34,29% C, 6,67% H, 13,32% N;
gefunden: 34,02% C, 6,74% H, 13,18% N.

Es war optisch-inaktiv und zeigte sowohl in Schmelzpunkt wie auch in Geschmack und Kristallform völlige Übereinstimmung mit dem einerseits aus Seide[1]), andererseits durch Synthese[2]) gewonnenen Serin. Das Produkt begann bei 220° sich zu bräunen und schmolz bei 243—244° unter Zersetzung.

Fraktion 115—140° (A).

Sie enthält u. a. die Ester von Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Zur Isolierung des Phenylalanins wurde sie zuerst mit dem doppelten Volumen Äther vermischt und die ätherische Lösung dreimal mit dem doppelten Volumen Wasser durchgeschüttelt, wobei die Ester der Glutaminsäure und Asparaginsäure ins Wasser gingen.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 177. Cramer, Journ. f. prakt. Chem. **96**, 76.
[2]) E. Fischer und H. Leuchs, Sitzungsber. d. kgl. Akademie d. Wissenschaften **6** [1902]. (*S. 253.*)

Die ätherische Lösung wurde eingedampft und der Rückstand mit starker Salzsäure auf dem Wasserbade abgeraucht. Der Rückstand ist alsdann ein Gemisch von salzsaurem Phenylalanin und einem sehr übelriechenden Öl. Dies letztere ließ sich mit Äther vom Phenylalanin trennen. Beim Abdampfen des Äthers hinterblieb es als gelbes schwefelhaltiges, aber stickstofffreies Öl (im ganzen 6 g), das besonders in der Verdünnung intensiv nach faulem Fleisch roch und bei 10 mm Druck zwischen 197 und 203⁰ kochte.

Das salzsaure Phenylalanin wurde nochmals aus starker Salzsäure gereinigt. Durch Abdampfen mit Ammoniak und Auslaugen des Rückstandes mit kaltem Wasser ließ sich das Phenylalanin leicht isolieren und durch Umkristallisieren aus heißem Wasser reinigen.

0,2197 g Substanz gaben 0,5181 g CO_2 und 0,1355 g H_2O.
0,1825 „ „ „ 13,2 ccm N bei 19,5⁰ und 767 mm.

$C_9H_{11}NO_2$ berechnet: 65,43 % C, 6,66 % H, 8,48 % N;
gefunden: 64,32 % C, 6,85 % H, 8,37 % N.

Das Produkt war zum größten Teil racemisiert, denn die optische Bestimmung gab $[\alpha]_D^{20^\circ} = +11,21$.

Die Ausbeute an Phenylalanin aus dieser Fraktion betrug 11 g, die Gesamtausbeute aus sämtlichen Fraktionen 26 g.

Die mit Baryt verseifte, wässerige Lösung der ätherlöslichen Ester dieser Fraktion bestand zum größten Teil aus Asparaginsäure und Glutaminsäure. Sie wurden mit dem entsprechenden Teil von 110 bis 135⁰ (B) zusammen weiter verarbeitet.

Fraktion 110—135⁰ (B).

Diese Fraktion wurde zunächst wieder auf Serin verarbeitet, es gelang noch 1,5 g desselben zu isolieren. Dann wurde genau wie bei der vorigen Fraktion das Phenylalanin (4 g) entfernt und der Rest mit Barytwasser verseift. Hierbei kristallisierten 8 g racemischer asparaginsaurer Baryt, während noch ein größerer Teil des Salzes der aktiven Säure in Lösung blieb.

Nach dem Ausfällen des Baryts wurde zunächst aus diesem Teil von A und B der größte Teil der Glutaminsäure mit konzentrierter Salzsäure entfernt, dann aus der salzsauren Lösung der Asparaginsäure die Salzsäure verdampft und schließlich mit Silbercarbonat gefällt und endlich die Asparaginsäure als Kupfersalz abgeschieden.

Das Kupfersalz wurde bei 130⁰ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,3291 g gaben 0,0954 g H_2O ab.

$C_4H_5NO_4Cu + 4^1/_2\ H_2O$ berechnet: 29,45 % H_2O;
gefunden: 28,99 % H_2O.

Die optische Bestimmung ergab, daß die aus dem Kupfersalz isolierte Säure fast reines optisch-aktives Produkt war. 0,5612 g Substanz in 6,8013 g 10-prozentiger Salzsäure gelöst; mithin 8,25 Prozentgehalt und 1,06 spez. Gewicht. Drehung im 2-Dezimeterrohr 3,84° nach rechts. Also

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +22,0.$$

Die aus dem kristallisierten Barytsalz isolierte Asparaginsäure war racemisch.

0,2196 g Substanz gaben 0,2900 CO_2 und 0,1057 g H_2O.
0,1597 „ „ „ 14,3 ccm N bei 17,5° und 760 mm.

$C_4H_7NO_4$ berechnet: 36,09 % C, 5,26 % H, 10,53 % N;
gefunden: 36,00 % C, 5,35 % H, 10,39 % N.

Fraktion 140—155° (A).

Die Fraktion enthielt Phenylalanin und Glutaminsäure neben wenig Asparaginsäure.

Fraktion 140—155° (B).

Nach dem Entfernen des Phenylalanins waren aus der wässerigen Lösung der Barytsalze 7 g eines schön kristallisierten Barytsalzes ausgefallen.

Es wurde als das Salz der racemischen Glutaminsäure erkannt. Die Analyse der freien Säure ergab folgende Zahlen:

0,1716 g Substanz gaben 0,2553 g CO_2, 0,0977 g H_2O.
0,1598 „ „ „ 12,8 ccm N bei 16° und 764 mm.

$C_5H_9NO_4$ berechnet: 40,81 % C, 6,12 % H, 9,52 % N.
gefunden: 40,56 % C, 6,32 % H, 9,38 % N.

Aus dem Barytsalz, welches in Wasser gelöst blieb, wurde aktive Glutaminsäure gewonnen.

0,5731 g Substanz in 9,4560 g 20-prozentiger Salzsäure gelöst; mithin 5,71 Prozentgehalt und 1,026 spez. Gewicht. Drehung im 2-Dezimeterrohr 3,74° nach rechts. Also

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +31,91,$$

während die aus Gelatine[1]) isolierte Glutaminsäure unter den gleichen Bedingungen

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = 30,45$$

und die aus Caseïn

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = +28,21$$

ergab.

---

[1]) Fischer, Aders u. Levene, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 70. (*S. 671.*)

Fraktion 155—195 (A) und Fraktion 155—185° (B).

Auch diese Fraktionen enthielten wiederum Phenylalanin und Glutaminsäure und außerdem eine bisher unter den Spaltungsprodukten der Proteïnkörpern noch nicht beobachtete Substanz, die Pyrrolidoncarbonsäure.

Für die Isolierung der letzteren wurden die Ester zunächst mit Baryt verseift, von den schwer löslichen Barytsalzen filtriert, das Filtrat vom Baryt mit Schwefelsäure genau befreit, dann zur Trockne verdampft und mit Alkohol ausgekocht. Nach dem Kochen mit Tierkohle schied die stark eingeengte alkoholische Lösung beim Erkalten die Pyrrolidoncarbonsäure in schön ausgebildeten, schneeweißen Kristallen ab, die bei 147° schmolzen.

0,1815 g Substanz gaben 0,3115 g CO_2 und 0,0942 g H_2O.
0,1991 g „ „ 18,9 ccm N bei 20° und 762 mm.

$C_5H_7NO_3$ berechnet: 46,51% C, 5,42% H, 10,86% N;
gefunden: 46,81% C, 5,76% H, 10,91% N.

Über den Ursprung dieser Säure kann man nicht zweifelhaft sein, sie ist offenbar aus Glutaminsäure, aus der sie auch schon früher erhalten wurde[1]), sekundär entstanden. Ihre Gesamtmenge betrug 15 g.

Ihre Bildung ist mit daran Schuld, daß die Ausbeute an Glutaminsäure verhältnismäßig gering war.

Es ist deshalb jedenfalls rationeller, die Glutaminsäure, wenn sie in irgendwie erheblicher Menge bei der Hydrolyse eines Proteïnstoffes entsteht, dadurch zu isolieren, daß man die ursprüngliche salzsaure Lösung stark eindampft und die Masse nach dem Sättigen mit Salzsäuregas der Kristallisation überläßt[2]).

Zum Schluß stellen wir die gesamten Mengen der von uns in den Spaltungsprodukten des Horns nachgewiesenen Aminosäuren zusammen in Prozenten 1. vom rohen und 2. vom getrockneten Horn.

1.	2.	
0,3%	0,34%	Glykocoll
1,0%	1,20%	Alanin
5,0%	5,70%	α-Aminoisovaleriansäure
16,0%	18,30%	Leucin
3,0%	3,60%	α-Pyrrolidincarbonsäure
0,6%	0,68%	Serin
2,6%	3,00%	Phenylalanin
2,2%	2,50%	Asparaginsäure

[1]) Monatsh. f. Chem. 3, 228. Gazz. Chim. 24 I, 370.
[2]) Hlasiwetz und Habermann, Ann. d. Chem. **169**, 150.

1.	2.	
2,6%	3,00%	Glutaminsäure
1,5%	1,70%	Pyrrolidoncarbonsäure
34,8%	40,02%	

Wie in früheren Fällen bemerken wir auch hier, daß alle diese Werte hinter der wirklichen Menge der Aminosäuren erheblich zurückbleiben. So ist der Glutaminsäuregehalt zweifelsohne viel größer, denn Horbaczewski fand denselben zu 15%.

Das Tyrosin und Cystin sind gar nicht berücksichtigt, dasselbe gilt von den Diaminosäuren, da diese Produkte, wie früher erwähnt, bei dem von uns eingeschlagenen Verfahren nicht gewonnen werden.

Wir machen endlich darauf aufmerksam, daß auch unser Verfahren keine erschöpfende Methode für die Aufsuchung der Monoaminosäuren ist, daß wir im Gegenteil das Vorhandensein verschiedener noch unbekannter Substanzen dieser Klasse im Horn vermuten müssen.

---

53. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente.

Zeitschrift für physiologische Chemie 39, 81 (1903).
(Eingegangen am 11. Juni.)

Bei der Hydrolyse der meisten Proteïnstoffe durch kochende Säuren entsteht, wie durch eine Reihe von Arbeiten aus dem hiesigen Institute nachgewiesen wurde, eine nicht unbeträchtliche Menge von α-Pyrrolidincarbonsäure. Für das Caseïn speziell wurde ferner bewiesen, daß die gleiche zyklische Aminosäure auch bei der Hydrolyse durch Alkali gebildet wird[1]). Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß dieselbe ebenso, wie die gewöhnlichen Aminosäuren, ein primäres Spaltprodukt der Proteïnstoffe sei. Ungleich sicherer würde dieser Schluß werden, wenn es gelänge, auch bei der enzymatischen Hydrolyse der Proteïnkörper Pyrrolidincarbonsäure zu gewinnen. Ein derartiger Versuch, welcher von Herrn P. Levene im hiesigen Institut ausgeführt wurde, ist von dem einen von uns bereits flüchtig erwähnt worden[2]). Es wurde damals eine sehr kleine Quantität von Pyrrolidincarbonsäure gefunden, aber erst nachdem zu ihrer Isolierung die Überführung in Ester mit Hilfe von Salzsäure angewandt worden war. Da die Möglichkeit nicht ausgeschlossen ist, daß bei der Veresterung in geringem Maße eine weitergehende Hydrolyse durch die Salzsäure eintritt, so haben wir den Versuch mit größerer Vorsicht wiederholt. Beim Caseïn, das am ausführlichsten studiert wurde, ergab sich folgendes überraschende Resultat. Die Verdauung durch Pankreasenzyme gibt, auch wenn sie monatelang fortgesetzt wird, keine mit den jetzigen Methoden (d. h. ohne die Veresterung) nachweisbare Menge von Pyrrolidincarbonsäure, dagegen findet sich in der Verdauungsflüssigkeit ein polypeptidartiger Stoff, der offenbar dem Enzym gänzlich widersteht, und der beim Kochen mit Salzsäure fast ebenso große Mengen von α-Pyrro-

---

[1]) Fischer, Notizen. I. Bildung von α-Pyrrolidincarbonsäure bei der Hydrolyse des Caseïns durch Alkali. Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 227. (*S. 691.*)

[2]) Fischer, Emil, Über die Hydrolyse des Caseïns durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 170 [1901]. (*S. 649.*)

lidincarbonsäure liefert, wie die entsprechende Menge Caseïn selbst. Genau dasselbe gilt merkwürdigerweise für das Phenylalanin.

Als Ferment verwandten wir nicht das gewöhnliche käufliche Trypsin (Grübler), sondern das sog. Pankreatin von der Firma Rhenania in Aachen, das durch größere Wirksamkeit ausgezeichnet ist. Unter den später angeführten Bedingungen gestaltet sich die Verdauung des Caseïns in folgender Weise. Zuerst wird Tyrosin bemerkbar, dessen Kristallisation nach mehreren Stunden beginnt und nach 1—2 Tagen beendet ist. Langsamer erscheinen dann in der Verdauungsflüssigkeit Leucin, Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure und, wie aus älteren Untersuchungen bekannt ist, auch die drei Diaminosäuren.

Die Biuretreaktion, die anfangs sehr stark ist und im Laufe der Zeit immer schwächer wird, war z. B. nach 6 Wochen anscheinend nicht stärker, als wie es der angewandten Menge Pankreatin entspricht. Auch nach 7-monatlicher Verdauung waren α-Pyrrolidincarbonsäure und Phenylalanin in der Flüssigkeit nicht nachweisbar. Sie finden sich im obenerwähnten polypeptidartigen Stoff. Dieser ist so leicht durch Phosphorwolframsäure fällbar, daß er leicht von den Monoaminosäuren getrennt werden kann. Durch mehrmalige Fällung mit Phosphorwolframsäure läßt er sich soweit reinigen, daß er die Biuretreaktion entweder gar nicht oder doch nur äußerst schwach liefert. Das Produkt ist also kein gewöhnliches Pepton. Bei seiner Hydrolyse durch kochende Salzsäure entstehen außer α-Pyrrolidincarbonsäure und Phenylalanin auch die übrigen als Spaltprodukte des Caseïns bekannten Monoaminosäuren: Leucin, Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure. Ob auch die Diaminosäuren hierhin zu zählen sind, müssen wir einstweilen unentschieden lassen.

Dieselben Erscheinungen, wie beim Caseïn, haben wir beim Edestin, Hämoglobin, Eieralbumin, Fibrin und Serumglobulin beobachtet.

Das beim Caseïn von uns erhaltene Resultat steht im Widerspruch mit den bisherigen Anschauungen der Physiologen. Aus dem Umstande, daß Tyrosin, Leucin, Glutaminsäure und Asparaginsäure und ferner die Diaminosäuren bei der tryptischen Verdauung nach relativ kurzer Zeit in Freiheit gesetzt wurden, hat man geschlossen, daß ein Totalzerfall des Moleküls bis zu diesen Spaltprodukten eintrete. Unsere Beobachtungen zeigen aber, daß die Hydrolyse unter solchen Bedingungen stets nur partiell ist, und daß schließlich ein widerstandsfähiger Rest bleibt, der zwar nicht mehr Pepton, aber doch ein kompliziertes Polypeptid ist und alle die Monoaminosäuren, die überhaupt bisher im Caseïn gefunden wurden, enthält. Da die fünf anderen, obenerwähnten Eiweißkörper sich ähnlich verhalten, so haben wir es hier wahrscheinlich mit einem ganz allgemeinen Phänomen zu tun, dessen

biologische Bedeutung sich augenblicklich nach ihrem ganzen Umfang noch nicht übersehen läßt. Jedenfalls wird dadurch die in neuerer Zeit vielfach ausgesprochene Ansicht, daß die Eiweißkörper im Darm völlig bis zu den Aminosäuren hydrolysiert werden, in hohem Grade unwahrscheinlich. Glücklicherweise besitzen wir in dem scharfen Nachweis der Pyrrolidincarbonsäure und des Phenylalanins ein bequemes Mittel, das Vorhandensein jenes interessanten Polypeptids festzustellen. Ob dasselbe ein einheitliches Individuum, oder ein Gemisch ähnlicher Stoffe ist, haben wir vorläufig noch nicht geprüft. Ebenso offen bleibt die Frage, ob das betreffende Produkt für die verschiedenen Eiweißkörper das gleiche ist. Endlich geben unsere Versuche auch nicht die gesuchte definitive Entscheidung bezüglich der Bildung der α-Pyrrolidincarbonsäure. Da sie bei der enzymatischen Spaltung der Eiweißkörper nicht in Freiheit gesetzt wird, so bleibt noch immer die Möglichkeit, daß sie sekundär durch die Wirkung von Säure oder Alkali bei höherer Temperatur aus einem bisher noch unbekannten Bestandteil des Eiweißmoleküls entsteht. Für wahrscheinlich halten wir dies allerdings nicht, besonders mit Rücksicht auf das Phenylalanin, bei welchem die Verhältnisse genau ebenso liegen; denn dieses hat seiner chemischen Zusammensetzung nach ebenso das Recht, als direkter Bestandteil des Eiweißmoleküls angesehen zu werden, wie die übrigen Monoaminosäuren.

Unsere Beobachtungen zeigen, daß auch bei den gewöhnlichen Eiweißkörpern hydrolytische Spaltprodukte auftreten, die zwischen den Peptonen und den Aminosäuren stehen. Sie schließen sich deshalb auf das engste den Resultaten an, welche bei der Hydrolyse des Seidenfibroïns früher erhalten wurden[1]). Hier wurde zum erstenmal die kombinierte Wirkung von Säuren, Fermenten und Basen zur Spaltung eines Proteïnstoffes benutzt und dadurch eine Serie von nicht weniger als vier Zwischenprodukten zwischen den ursprünglichen Proteïnstoffen und den Aminosäuren beobachtet. Die Wirkung der Salzsäure gab zunächst das schon bekannte Sericoïn, dann bei längerer Dauer der Operation ein peptonartiges Produkt, welches Tyrosin enthält. Durch Trypsin oder Pankreatin konnte aus diesem das Tyrosin abgespalten und ein neuer peptonartiger Stoff erhalten werden, der keine Spur

---

[1]) Emil Fischer und Peter Bergell, Vortrag auf der Naturforscherversammlung in Karlsbad, Sept. 1902. Ein von mir verfaßtes Referat über diesen Vortrag findet sich unter dem Titel „Über die Hydrolyse der Proteïnstoffe" in der Chemiker-Zeitung, 4. Okt. 1902, Jahrg. **26**, Nr. 80. Die ausführliche Publikation über diese Versuche ist durch längere Krankheit von Dr. Bergell und durch den Wunsch, das dipeptidartige Produkt synthetisch zu gewinnen, verzögert worden. Sie soll aber in nächster Zeit erfolgen. (*S. 621.*) E. Fischer.

von Tyrosin mehr enthielt. Als letzterer dann vorsichtig mit warmem Barytwasser zerlegt wurde, entstand unter anderen ein Körper, der höchstwahrscheinlich in die Klasse der Dipeptide gehört. Wir zweifeln nicht daran, daß die Übertragung dieser Methoden auf die gewöhnlichen Eiweißkörper zu ähnlichen Resultaten führen wird, und daß es dereinst, wenn bessere Isolierungsmethoden für die Polypeptide gefunden sind, gelingen wird, den hydrolytischen Abbau der Proteïne in einer noch viel größeren Anzahl von Stufen durchzuführen.

Die Beobachtung, daß ein Teil des Eiweißmoleküls der vollständigen Hydrolyse durch Pankreasenzyme starken Widerstand leistet, ist keineswegs neu. Wir erinnern an die Versuche von Kühne[1]), der für seine Antipeptone gerade diese Eigenschaften hervorhebt, ferner an die Mitteilung von Pick[2]) und endlich an die in neuester Zeit erschienenen Arbeiten von M. Siegfried[3]) und seinen Schülern. Dieser kommt zu dem Schluß, „daß bei der Einwirkung von Trypsin auf Eiweiß ein Teil desselben unter Bildung von Aminosäuren und Basen leicht zersetzt wird, und daß hierbei Peptone gebildet werden, welche die Tyrosingruppe nicht enthalten und der weiteren Aufspaltung durch Trypsin hartnäckig widerstehen". Dieser Satz ist richtig, wenn die Verdauung nicht allzu lange fortgesetzt wird. Im anderen Falle aber werden die Peptone weiter gespalten, wie das Verschwinden der Biuretreaktion zeigt, und es resultiert schließlich das polypeptidartige Produkt, welches von uns als Derivat der α-Pyrrolidincarbonsäure und des Phenylalanins gekennzeichnet ist. Besondere Beachtung verdient noch die feste Bindung des Phenylalanins in den Proteïnstoffen im Gegensatz zu dem so nah verwandten Tyrosin. Letzteres erscheint in der Regel zuerst als Spaltungsprodukt bei der Verdauung von Eiweißkörpern. Bei dem obenerwähnten Pepton aus Seidenfibroïn erfolgt die Abspaltung des Tyrosins durch Trypsin so rasch, daß das Phänomen fast wie eine Kristallisation der Aminosäure aus warmem Wasser aussieht. Ähnliche Erfahrungen, über die an anderer Stelle berichtet werden soll, haben die Versuche mit synthetischen Polypeptiden, welche Tyrosin enthalten, gegeben.

---

[1]) W. Kühne, Verdauung der Eiweißstoffe durch den Pankreassaft. Virchows Archiv **39**, 130 (1867). Jd. Weitere Mitteilungen über die Verdauungsenzyme und die Verdauung der Albumine. Verhdl. des Heidelberger naturhist.-mediz. Vereins, N. F. **1**, 236 (1876). W. Kühne und R. H. Chittenden, Die nächsten Spaltungsprodukte der Eiweißkörper, Zeitschr. f. Biologie **19**, 159 (1883). Dieselben: Über die Peptone. Zeitschr. f. Biologie **22**, 423 (1885).

[2]) Pick, E. P., Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 219 [1899].

[3]) M. Siegfried, Über Peptone. Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**, 259 [1903].

Wir beabsichtigen, die Produkte, die bei der partiellen Spaltung der Proteïnstoffe mit Säuren entstehen, in ähnlicher Art auf ihren Gehalt an Pyrrolidincarbonsäure und Phenylalanin zu prüfen. Das scheint uns um so notwendiger, als nach den Mitteilungen von M. Siegfried[1]) die Spaltung durch Säuren in anderem Sinne zu verlaufen scheint, als diejenige mit Enzymen.

Ferner verdient die Frage, ob die kombinierte Wirkung von Pepsin bzw. Papayotin und von Trypsin das gleiche Resultat wie die Trypsinverdauung allein hat, sorgfältig geprüft zu werden.

Experimenteller Teil.

Bei der Verdauung der Eiweißkörper durch Trypsin oder Pankreatin entsteht α-Pyrrolidincarbonsäure nicht in solcher Menge, daß sie mit den jetzigen Methoden erkannt werden kann.

1. 100 g Caseïn. pur. (Hammarsten) wurden in 1000 ccm Wasser suspendiert, mit 2 ccm Ammoniak, Toluol und Chloroform versetzt und 8 Tage lang mit 2 g Pankreatinum purum (Rhenania) im Brutraum bei 36—37⁰ verdaut. Die vom ausgeschiedenen Tyrosin und Leucin abfiltrierte Flüssigkeit wurde hierauf im Vakuum bei einer 50⁰ nicht übersteigenden Temperatur auf die Hälfte eingedampft, mit Alkohol gefällt, vom Niederschlag abfiltriert und weiter eingeengt. Die Alkoholfällung wurde 5—6 mal wiederholt. Der zuletzt verbleibende alkoholische Auszug wurde eingedampft. Der Rückstand roch nach Indolderivaten. Derselbe wurde mit gefälltem Kupferoxyd gekocht. Das sich bildende Kupfersalz ließ sich in einen alkohollöslichen und einen alkoholunlöslichen Teil zerlegen, aber Pyrrolidincarbonsäure war in keinem der beiden Teile mit Sicherheit nachweisbar.

Ganz dasselbe Resultat gaben die folgenden Versuche 2—6.

2. 100 g Caseïn. pur. (H.) wurden in 1500 ccm Wasser suspendiert, mit 2 ccm Ammoniak, Toluol und Chloroform versetzt und 8 Tage lang mit 4 g Pankreatin verdaut.

3. 200 g Caseïn in derselben Weise mit 2 × 3 g Pankreatin 14 Tage verdaut. Flüssigkeitsmenge 2000 ccm.

4. 250 g Caseïn 14 Tage mit 3 × $2^1/_2$ g Pankreatin verdaut. Flüssigkeitsmenge 2000 ccm.

5. 500 g Caseïn in 5000 ccm Wasser suspendiert und mit 10 g Pankreatin während 50 Tagen verdaut. 100 g des Verdauungsgemisches wurden nach dieser Zeit in der oben geschilderten Weise untersucht.

---

[1]) M. Siegfried, Zur Kenntnis der Hydrolyse des Eiweißes. Berichte der math.-phys. Klasse der kgl. sächs. Gesellsch. f. Wissenschaften zu Leipzig. Sitzung vom 2. März 1903.

6. 200 g Plasmon (Caseïnnatron) waren 7 Monate lang mit 4 g Pankreatin verdaut und hierauf noch weitere 14 Tage mit nochmals 4 g Pankreatin im Brutraum stehen gelassen worden. Flüssigkeitsmenge 2000 ccm. Die Biuretreaktion war hier bei dem Niederschlag mit Phosphorwolframsäure ganz verschwunden.

Unter denselben Bedingungen wurden Edestin, Serumglobulin, Eieralbumin, Hämoglobin und Fibrin untersucht.

a) Edestin (100 g) 12 Wochen mit 2 × 2,5 g Pankreatin verdaut. Flüssigkeitsmenge 1000 ccm.

b) Serumglobulin (100 g) 25 Tage mit 5 × 2 g Pankreatin. Flüssigkeitsmenge 1000 ccm.

c) Eieralbumin (100 g) 21 Tage mit 2 × 2 g Pankreatin. Flüssigkeitsmenge 1000 ccm.

d) Hämoglobin (100 g) 12 Wochen mit 3 × 2 g Pankreatin. Flüssigkeitsmenge 1000 ccm.

e) Fibrin (100 g) wurden mit 2 g Pankreatin eine Woche lang verdaut. Flüssigkeitsmenge 1000 ccm.

In allen Fällen war es unmöglich, freie Pyrrolidincarbonsäure nach dem geschilderten Verfahren nachzuweisen.

Bei der Verdauung des Caseïns entsteht neben Tyrosin, Leucin, Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure als Endprodukt ein polypeptidartiger Stoff, der bei weiterer Hydrolyse mit kochender Salzsäure reichliche Mengen von α-Pyrrolidincarbonsäure und Phenylalanin liefert.

1. 100 g Caseïn. pur. (Hammarsten) wurden in 1000 ccm Wasser suspendiert, mit 2 ccm Ammoniak, Toluol und Chloroform versetzt und 8 Tage lang im Brutraum bei 36—37° mit 3 g Pankreatin verdaut. Die Biuretreaktion war deutlich vorhanden[1]). Nachdem das ausgeschiedene Tyrosin abfiltriert war, wurde die Flüssigkeit zur Vertreibung des freien Ammoniaks bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur im Vakuum eingeengt, dann auf 2000 ccm gebracht und mit Phosphorwolframsäure im Überschuß gefällt[2]). Der Niederschlag wurde abgesaugt, dann mit der hydraulischen Presse ausgepreßt, nun in einer

---

[1]) Bei der Ausführung der Biuretreaktion ist darauf zu achten, daß genügend Alkali vorhanden ist. Ferner scheint es nicht überflüssig, darauf hinzuweisen, daß Pankreatin selbst eine intensive Biuretreaktion gibt.

[2]) Diese starke Verdünnung und der Überschuß der Phosphorwolframsäure wurden in Hinsicht auf die Angaben von E. Schulze und E. Winterstein (Trennung des Phenylalanins von anderen Aminosäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 123 [1902]) verwendet. Caseïn enthält ca. 3—3½% Phenylalanin. Nach E. Schulze und E. Winterstein wird eine ca. 0,5-prozentige Lösung von Phenylalanin bei Gegenwart von Leucin mit Phosphorwolframsäure nicht mehr gefällt. Eigene Versuche bestätigen diese Angaben.

Reibschale fein gepulvert, in Wasser suspendiert und mit überschüssigem Baryt während 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt. Nachdem der phosphorwolframsaure Baryt abgesaugt und hydraulisch abgepreßt war, wurde das Filtrat mit Schwefelsäure vom überschüssigen Baryt befreit, dann nochmals mit überschüssiger Phosphorwolframsäure gefällt und der Niederschlag in genau derselben Weise, wie oben geschildert, abgepreßt und zerlegt.

Die vereinigten Filtrate von den beiden Phosphorwolframsäurefällungen wurden im Vakuum eingedampft und der Rückstand hierauf mit rauchender Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, um alle etwa noch vorhandenen Polypeptide zu spalten. Die Flüssigkeit färbte sich dabei violett. Sie wurde nun im Vakuum zum Sirup eingedampft und letzterer zum Nachweis der Aminosäuren in der bekannten Weise verestert.

Die Destillation der Ester gab folgende Fraktionen:

1.	0 bis 40°	(Temperatur des Wasserbades)	bei	12	mm Druck	1,0 g
2.	40 „ 100°	(„ „ „)	„	12	„ „	4,0 „
3.	„ 100°	(„ „ „)	„	0,2	„ „	10,5 „
4.	100 „ 160°	(„ „ Ölbades)	„	0,2	„ „	12,5 „

Isoliert wurden 0,2 g Alanin, 5 g Leucin, 3 g Glutaminsäure, 0,5 g Asparaginsäure.

Phenylalanin und Pyrrolidincarbonsäure wurden nicht aufgefunden. Auf die Isolierung des Tryptophans, dessen Reaktion die Flüssigkeiten stark zeigten, sowie der Oxyaminosäuren haben wir verzichtet.

Der zerlegte Phosphorwolframsäureniederschlag wurde nach dem Absaugen und Abpressen des phosphorwolframsauren Baryts mit Schwefelsäure vom überschüssigen Baryt befreit, hierauf im Vakuum eingedampft. Der Rückstand war anfangs ein Sirup, der aber zu einer amorphen, schwach gelb gefärbten leimartigen Masse eintrocknete. Er löste sich äußerst leicht in Wasser und fiel auf Zusatz von Alkohol in amorphen Flocken wieder aus. Wir werden später versuchen, dieses Rohprodukt, welches aller Wahrscheinlichkeit nach Arginin, Lysin und Histidin enthält, weiter zu reinigen. Für den vorliegenden Zweck war dies überflüssig, da die Diaminosäuren, wie wir nochmals durch einen besonderen Versuch festgestellt haben, beim Kochen mit Salzsäure keine Pyrrolidincarbonsäure liefern. Dieser amorphe polypeptidartige Rückstand wurde nun zur Hydrolyse mit rauchender Salzsäure am Rückflußkühler während 6 Stunden gekocht, wobei sich die Lösung ebenso stark dunkelviolett färbte, wie bei Anwendung des Caseïns selbst. Die Flüssigkeit wurde schließlich im Vakuum zum Sirup eingeengt und verestert.

Bei der Destillation des Estergemisches resultierten folgende Fraktionen:

1.	0 bis 40° (Temperatur des Wasserbades)	bei 12 mm Druck	0,5 g
2.	40 „ 100° („ „ „)	„ 12 „ „	1,5 „
3.	„ 100° („ „ „)	„ 0,3 „ „	4,0 „
4.	100 „ 160° („ „ Ölbades)	„ 0,3 „ „	17,0 „

Isoliert wurden 0,1 g Alanin, 2 g Leucin, 4 g Glutaminsäure, 1 g Asparaginsäure, ferner 1,5 g α-Pyrrolidincarbonsäure und 2,2 g Phenylalanin[1]).

Analyse der Pyrrolidincarbonsäure:

0,1002 g Substanz gaben 0,1912 g CO_2 und 0,0713 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_9NO_2$:	Gefunden:
52,18% C und 7,83% H.	52,04% C und 7,97% H

Schmelzpunkt gegen 205° (unkorr.).

Das Phenylalanin gab folgende Zahlen:

0,2061 g Substanz gaben 0,4953 g CO_2 und 0,1251 g H_2O.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_2$:	Gefunden:
65,45% C und 6,66% H.	65,54% C und 6,80% H.

Schmelzpunkt gegen 283° (unkorr.).

2. 100 g Caseïn. pur. (H.) wurden in 1000 ccm Wasser suspendiert, unter ganz den gleichen Bedingungen wie in Versuch 1 mit 3 g Pankreatin 8 Tage lang verdaut und die Verdauungsflüssigkeit genau so wie bei Versuch 1 verarbeitet.

Die vereinigten Filtrate von den beiden Phosphorwolframsäureniederschlägen gaben nach erfolgter Veresterung des Rückstandes folgendes Resultat:

Fraktion 1:	bis 100° (Temp. d. Wasserbades)	bei 12 mm Druck	3,5 g
„ 2:	„ 100° („ „ „)	„ 0,2 „ „	12,0 „
„ 3:	100 „ 160° („ „ Ölbades)	„ 0,2 „ „	11,0 „

Isoliert wurden 0,1 g Alanin, 5,5 g Leucin, 3 g Glutaminsäure, 1 g Asparaginsäure.

Phenylalanin und Pyrrolidincarbonsäure wurden nicht erhalten.

Die zweite Phosphorwolframsäurefällung zeigte nur ganz schwache Biuretreaktion und gab folgende Esterfraktionen:

Fraktion 1:	bis 100° (Temp. d. Wasserbades)	bei 12 mm Druck	2,5 g
„ 2:	„ 100° („ „ „)	„ 0,3 „ „	6,0 „
„ 3:	100 „ 160° („ „ Ölbades)	„ 0,3 „ „	15,0 „

---

[1]) Die Methode der Isolierung betreffend vgl.: Emil Fischer und Emil Abderhalden, Hydrolyse des Oxyhämoglobins durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 273 [1902]. (*S. 699.*)

Isoliert wurden 0,3 g Alanin, 3 g Leucin, 2,5 g Glutaminsäure, 0,8 g Asparaginsäure und ferner 2,2 g Pyrrolidincarbonsäure und 2,8 g Phenylalanin.

Das isolierte Phenylalanin schmolz gegen 280⁰ (unkorr.) und hatte die richtige Zusammensetzung.

0,2101 g Substanz gaben 0,5050 g CO_2 und 0,1255 g H_2O.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_2$:	Gefunden:
65,45% C und 6,66% H.	65,55% C und 6,69% H.

Die Analyse der gegen 207⁰ (unkorr.) schmelzenden α-Pyrrolidincarbonsäure gab folgende Zahlen:

0,2012 g Substanz gaben 0,3844 g CO_2 und 0,1432 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_9NO_2$:	Gefunden:
52,18% C und 7,83% H.	52,10% C und 7,97% H.

3. 200 g Caseïn. pur. (H.) wurden mit 2 × 2 g Pankreatin 14 Tage lang verdaut. Die Verdauungsflüssigkeit gab eine ganz schwache Biuretreaktion.

Auch bei diesem Versuche konnte im Filtrate der Phosphorwolframsäurefällung weder Phenylalanin noch Pyrrolidincarbonsäure nachgewiesen werden.

Aus der zweiten Phosphorwolframsäurefällung wurden 5,2 g Phenylalanin (Schmelzpunkt 281⁰ [unkorr.]) und 6,2 g α-Pyrrolidincarbonsäure (Schmelzpunkt 204⁰ [unkorr.]) erhalten.

4. 250 g Caseïn. pur. (H.) mit 4 × 2 g Pankreatin während 14 Tagen verdaut.

Ausgeschieden hatten sich 14 g Leucin und Tyrosin. Die Biuretreaktion war vorhanden, aber sehr schwach.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag ergab nach der Veresterung folgende Fraktionen:

Fraktion 1:	0 bis 100⁰	(Temp. d. Wasserbades)	bei 14 mm	Druck	5,0 g
„ 2:	„ 100⁰	(„ „ „)	„ 0,5 „	„	40,0 „
„ 3:	100 „ 160⁰	(„ „ Ölbades)	„ 0,5 „	„	25,0 „

Isoliert wurden 1,5 g Alanin, 32 g Leucin, 10 g Glutaminsäure und 3 g Asparaginsäure. Auch in diesem Versuche wurde keine Spur Phenylalanin und Pyrrolidincarbonsäure gefunden.

Der zerlegte Phosphorwolframsäureniederschlag gab folgende Fraktionen:

Fraktion 1:	0 bis 100⁰	(Temp. d. Wasserbades)	bei 13 mm	Druck	3,0 g
„ 2:	„ 100⁰	(„ „ „)	„ 0,3 „	„	23,0 „
„ 3:	100 „ 160⁰	(„ „ Ölbades)	„ 0,3 „	„	19,0 „

Isoliert wurden 1 g Alanin, 10 g Leucin, 6 g Glutaminsäure, 1,5 g Asparaginsäure, 5,2 g Pyrrolidincarbonsäure und 6 g Phenylalanin.

5. 150 g Caseïn. pur. (H.) wurden 4 Wochen mit 2 × 3 g Pankreatin verdaut. Die Biuretreaktion war nur schwach angedeutet. Während das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag keine Spur von Phenylalanin und Pyrrolidincarbonsäure gab, wurden aus dem Niederschlag selbst 4 g Pyrrolidincarbonsäure (Schmelzpunkt 206° [unkorr.]) und 5 g Phenylalanin (Schmelzpunkt 281° [unkorr.]) isoliert.

6. 500 g Caseïn. pur. (H.) wurden mit 10 g Pankreatin während 50 Tagen verdaut. Die Biuretreaktion war noch vorhanden, aber sehr schwach. Von dieser Verdauungsflüssigkeit wurden $^1/_5$ zur direkten Prüfung auf Pyrrolidincarbonsäure und $^2/_5$ zur Phosphorwolframsäurefällung verwendet; die übrigen $^2/_5$ wurden mit 4 g Pankreatin noch 2 Wochen lang verdaut und hierauf ebenfalls mit Phosphorwolframsäure gefällt.

In der nach 50 Tagen entstandenen Verdauungsflüssigkeit war das Resultat genau den in den vorigen Versuchen erhaltenen entsprechend.

Die nach 64 Tagen untersuchte Probe gab nur noch eine äußerst schwache Biuretreaktion. Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag enthielt kein Phenylalanin, dagegen konnten 0,23 g Pyrrolidincarbonsäure, die wohl aus dem in Lösung gebliebenen Polypeptid durch das Kochen mit Salzsäure entstanden war, isoliert werden.

Der zerlegte Phosphorwolframsäureniederschlag enthielt 5,2 g Phenylalanin und 5,8 g Pyrrolidincarbonsäure.

7. 100 g Caseïn. pur. (H.) wurden mit 4 × 2 g Pankreatin während 8 Wochen verdaut. Die Biuretreaktion war nur noch angedeutet. Die Phosphorwolframsäurefällung gab genau dasselbe Resultat, wie die bereits mitgeteilten Versuche.

8. 200 g Plasmon (käufliches Caseïn-Natron) waren 7 Monate lang mit 4 g Pankreatin verdaut worden. Die Biuretreaktion war nur noch sehr schwach vorhanden. Nach neuem Zusatz von 4 g Pankreatin und erneuter 3 Wochen dauernder Verdauung gab der Niederschlag mit Phosphorwolframsäure keine Biuretreaktion mehr.

Bei der Veresterung des Rückstandes, den das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag hinterließ, wurden weder Phenylalanin noch Pyrrolidincarbonsäure gefunden.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag selbst enthielt: Alanin, Leucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Phenylalanin (2,2 g) und Pyrrolidincarbonsäure (1 g).

Ähnliche Resultate wie beim Caseïn erhielten wir beim Edestin, Hämoglobin, Serumglobulin, Eieralbumin und Fibrin.

Die Verdauung wurde unter genau den gleichen Bedingungen angestellt.

a) 100 g Edestin mit 2 × 2,5 g Pankreatin 12 Wochen lang verdaut.
b) 100 g Serumglobulin 25 Tage mit 5 × 2 g Pankreatin.
c) 100 g Eieralbumin 21 Tage lang mit 2 × 2 g Pankreatin.
d) 100 g Hämoglobin 12 Wochen lang mit 3 × 2 g Pankreatin.
e) 100 g Fibrin mit 2 g Pankreatin während einer Woche.

Die Biuretreaktion war in allen Fällen noch vorhanden, aber meistens schwach und würde wahrscheinlich bei längerer Dauer der Versuche verschwunden sein.

Hervorzuheben ist, daß im Gegensatz zum Fibrin, Edestin, Eieralbumin und Hämoglobin das Serumglobulin dem Pankreatin einen erheblich größeren Widerstand leistete und eine viel größere Menge von Produkten, die durch Phosphorwolframsäure fällbar waren, lieferte.

In allen Fällen fanden sich Phenylalanin und Pyrrolidincarbonsäure nur im Phosphorwolframsäureniederschlag, ebenso war das Glykocoll, welches bekanntlich aus Edestin und Serumglobulin entsteht, ausschließlich im Phosphorwolframsäureniederschlag vorhanden.

Bei obigen Versuchen wurde die Trennung der Monoaminosäuren von dem nur partiell verdauten Teil des Proteïnmoleküls durch Phosphorwolframsäure bewerkstelligt. Da in der Literatur verschiedene Angaben existieren, daß diese Methode ungenaue Resultate gebe, und da ferner E. Schulze und E. Winterstein (l. c.) darauf aufmerksam gemacht haben, daß das Phenylalanin bei stärkerer Konzentration durch Phosphorwolframsäure gefällt wird, so haben wir einen besonderen Versuch angestellt, um die Brauchbarkeit der Methode zu prüfen.

100 g Caseïn wurden mit der 3-fachen Menge Salzsäure 6 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht und hierauf, nachdem die ganze Flüssigkeit auf 1500 ccm gebracht worden war, mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde hierauf abgesaugt und mit der hydraulischen Presse ausgepreßt. Die letzte Operation ist sehr wichtig, denn aus dem auf der Nutsche abgesaugten und fest gepreßten Niederschlage ließ sich mit der hydraulischen Presse noch fast $^1/_6$ der Gesamtflüssigkeit gewinnen. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in der oben geschilderten Weise zerlegt. Nach erfolgter Entfernung des überschüssigen Baryts mit Schwefelsäure wurde die Phosphorwolframsäurefällung wiederholt und der Niederschlag, wie oben geschildert, behandelt. Die schließlich resultierende Flüssigkeit, welche die durch Phosphorwolframsäure gefällten Körper enthielt, wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand verestert. Es konnten aber keine in Äther löslichen Ester isoliert werden, dagegen war beim Versuch, die Ester in Freiheit zu setzen, ein deutlicher Estergeruch wahrnehmbar. Mithin sind sicher nur Spuren von Monoaminosäuren vorhanden gewesen.

---

54. Emil Fischer: Nachtrag zur Hydrolyse des Caseïns und Seidenfibroïns durch Säuren.

Zeitschrift für physiologische Chemie **39**, 155 (1903).
(Eingegangen am 26. Juni.)

Auf die Bedeutung der Oxyaminosäuren als Spaltungsprodukte der Proteïnstoffe habe ich früher wiederholt hingewiesen, und mit Hilfe der verbesserten Erkennungsmethoden war es nicht schwer, ihre weite Verbreitung festzustellen.

Das früher nur aus dem Seidenleim isolierte Serin wurde zuerst im Seidenfibroïn[1]), dann im Horn[2]) aufgefunden, und seither haben weitere Untersuchungen aus dem hiesigen Institut gezeigt, daß es auch im Oxyhämoglobin[3]), Serumalbumin[4]) und Edestin[5]) vorkommt.

Seltener ist die Oxypyrrolidincarbonsäure, die ich zuerst aus Gelatine gewann[6]), wieder aufgefunden worden, aus dem einfachen Grunde, weil ihr Nachweis ziemlich schwierig ist.

Da nun beim Caseïn die neuen Methoden zur Erkennung und Trennung der Aminosäuren vorzugsweise ausgearbeitet worden sind[7]), so schien es mir nicht überflüssig, auch hier auf die Anwesenheit der beiden Oxysäuren zu prüfen.

Serin und Oxy-α-pyrrolidincarbonsäure aus Caseïn.

Zum Nachweis des Serins diente vorzugsweise die Fraktion der Ester, die bei 0,25 mm Druck zwischen 95 und 130° siedet. Ihre Menge betrug 110 g aus einem Kilo Caseïn (nach Hammarsten). Als sie mit der 20-fachen Menge Petroläther vermischt wurde, entstand eine ölige Fällung, die nach einiger Zeit mechanisch abgetrennt wurde. Sie ent-

---

1) Fischer und A. Skita, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 221. (*S. 686.*)
2) Fischer u. Th. Dörpinghaus, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 462. (*S. 703.*)
3) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 484. (*S. 740.*)
4) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 495. (*S. 749.*)
5) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 499. (*S. 749.*)
6) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2660. (*S. 680.*)
7) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 151. (*S. 633.*)

hält die Ester des Serins, der Asparagin- und Glutaminsäure und wenig Phenylalaninester.

Ihr Gewicht betrug 32 g; sie wurde zunächst mit Äther vermischt und dann mehrmals mit dem gleichen Volumen Wasser durchgeschüttelt. Das Phenylalanin und kleinere Mengen von Glutamin- und Asparaginsäureester bleiben in dem Äther. Der Serinester wird dagegen neben dem Rest von Glutamin- und Asparaginsäureester durch das Wasser aufgenommen. Zur Verseifung wird die wässerige Lösung mit überschüssigem Barytwasser zwei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt, dann der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ ausgefällt und das Filtrat mit überschüssigem Kupferoxyd gekocht; beim Abkühlen scheidet sich aus der filtrierten tiefblauen Lösung das schwerlösliche asparaginsaure Kupfer ab. Die Mutterlauge enthält das Serinkupfer, außerdem noch ziemlich viel glutaminsaures Kupfer neben wenig asparaginsaurem Salz. Das Kupfer wird mit Schwefelwasserstoff ausgefällt, das Filtrat im Vakuum eingeengt und aus dem Rückstand durch sehr konzentrierte Salzsäure die Glutaminsäure ausgefällt. Nachdem die Kristallisation des Hydrochlorates bei 0° möglichst vollständig geworden ist, wird filtriert und aus der Mutterlauge durch Eindampfen im Vakuum und Behandeln mit Silbercarbonat die Salzsäure entfernt. Aus dem stark eingedampften Filtrat scheidet sich das Serin ab und wird durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Wasser gereinigt. Seine Menge betrug 3,4 g aus einem Kilo Caseïn; weitere 0,9 g wurden auf dieselbe Art aus der Fraktion 60—95° gewonnen, so daß die Gesamtausbeute 4,3 g betrug. Das entspricht noch nicht ganz 0,5% vom angewandten Caseïn. In Wirklichkeit ist die Menge aber wohl erheblich größer, da bei der Abscheidung der Ester und der späteren Isolierung der freien Säuren gerade für die Oxyaminosäuren erhebliche Verluste unvermeidlich sind.

Das reine Produkt schmolz bei 241° (korr.) und gab folgende Zahlen:

0,2001 g Substanz gaben 0,2500 g CO_2 und 0,1215 g H_2O.
0,1620 „ „ „ 18,4 ccm N bei 17° und 758 mm.

Berechnet $C_3H_7O_3N$:	34,30% C,	6,67% H,	13,30% N.
Gefunden	34,07% C,	6,75% H,	13,18% N.

Es zeigte auch in Kristallform, Geschmack und Löslichkeit die Eigenschaften des Serins und gab wie dieses eine β-Naphtalinsulfoverbindung, die den richtigen Schmelzpunkt 214° besaß.

Zum Nachweis der Oxypyrrolidincarbonsäure unter den Spaltungsprodukten des Caseïns wurde dasselbe Verfahren wie beim Leim benutzt[1]), dessen Beschreibung deshalb hier überflüssig erscheint. Ein

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2660. (*S. 680.*)

Kilo Caseïn gab allerdings nur 2,3 g reine kristallisierte Säure vom Schmelzpunkt 270°, aber ihre Menge dürfte auch erheblich größer sein, da die Abscheidung keineswegs quantitativ ist.

Die Analyse der Säure gab folgende Zahlen:

0,1446 g Substanz gaben 0,2420 g CO_2 und 0,0141 H_2O.
0,1665 „ „ „ 16,1 ccm N bei 22° und 758 mm.

Berechnet $C_5H_9O_3N$: 45,80% C, 6,86% H, 10,69% N.
Gefunden 45,64% C, 7,03% H, 10,92% N.

Zur weiteren Charakteristik diente die β-Naphtalinsulfoverbindung[1]), die bei 90—91° schmolz und folgende Zahlen lieferte:

0,1529 g Substanz gaben 0,2991 g CO_2 und 0,0701 H_2O.

Berechnet $C_{15}H_{15}O_5NS + H_2O$: 53,09% C, 5,01% H.
Gefunden 53,34% C, 5,09% H.

α-Pyrrolidincarbonsäure aus Seidenfibroïn.

Während die gewöhnlichen Eiweißkörper ziemlich erhebliche Mengen von Pyrrolidincarbonsäure bei der Hydrolyse liefern, konnte dieses Spaltungsprodukt beim Seidenfibroïn bisher nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Die folgenden Beobachtungen füllen diese Lücke aus.

200 g Seidenfibroïn, welches in der früher beschriebenen Weise vom Seidenleim befreit war, wurde mit Schwefelsäure hydrolysiert[2]), das Tyrosin nach dem Ausfällen der Schwefelsäure durch Kristallisation abgeschieden und die Mutterlauge, welche die übrigen Aminosäuren enthält, im Vakuum zur Trockne verdampft. Zur Isolierung der Pyrrolidincarbonsäure diente ihre Löslichkeit in Alkohol. Das Gemisch der freien Aminosäuren wurde mit 2 L absolutem Alkohol tüchtig ausgekocht. Beim Verdampfen der alkoholischen Lösung blieben 4,2 g eines dicken Sirups, der den charakteristischen Geruch der Fleischbrühe besaß; er wurde mit 40 ccm Alkohol aufgenommen und nach dem Kochen mit Knochenkohle das erkaltete Filtrat vorsichtig mit Äther versetzt, bis die Kristallisation der α-Pyrrolidincarbonsäure eintrat. Von ihr wurden 0,6 g erhalten, die gegen 207° (korr.) schmolzen und die richtige Zusammensetzung zeigten.

0,1755 g Substanz gaben 0,3342 g CO_2 und 0,1281 g H_2O.

Berechnet $C_5H_9O_2N$: 52,18% C, 7,83% H.
Gefunden 51,93% C, 8,16% H.

Aus der Mutterlauge der Säure fällt auf Zusatz von mehr Äther ein amorphes, stark hygroskopisches Produkt aus, welches mit Wasser

---

[1]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3785. (*S. 202.*)
[2]) E. Fischer und A. Skita, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 177. (*S. 657.*)

gekocht den schon erwähnten charakteristischen Geruch nach Fleischextrakt in hohem Maße zeigte, und in dem man eine neue Aminosäure vermuten darf.

Bemerkenswert ist die kleine Quantität der Pyrrolidincarbonsäure im Fibroïn, besonders mit Rücksicht auf die ebenfalls sehr geringe Menge der Diaminosäuren. Diese quantitative Beziehung zwischen der zyklischen Säure und den Diaminoverbindungen scheint allgemein zu sein und gibt der Vermutung Raum, daß sie einen gemeinsamen Ursprung haben.

Bei der Ausführung obiger Versuche bin ich von Herrn Dr. Th. Dörpinghaus aufs eifrigste unterstützt worden, wofür ich ihm auch hier besten Dank sage.

---

55. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Über die Verdauung des Caseïns durch Pepsinsalzsäure und Pankreasfermente.

Zeitschrift für physiologische Chemie 40, 215 (1903).
(Eingegangen am 1. November.)

Bei der Verdauung des Caseïns durch sog. Pankreatin entsteht, wie wir vor kurzem[1]) gezeigt haben, ein polypeptidartiger Stoff, der bei der totalen Hydrolyse durch Säuren reichliche Mengen von α-Pyrrolidincarbonsäure liefert. Dagegen war diese Aminosäure selbst in der Verdauungsflüssigkeit mit den bisher bekannten Methoden nicht nachweisbar, wenn wir auf die Veresterungsmethode verzichteten, bei der die Wirkung der Säure eine sekundäre Zersetzung hervorrufen konnte. Wir mußten deshalb unentschieden lassen, ob α-Pyrrolidincarbonsäure durch enzymatische Spaltung der Proteïnstoffe gebildet wird. Seitdem ist eine Mitteilung von Salaskin und Kowalevsky[2]) über die Wirkung von Hundemagensaft auf Hämoglobin erschienen. Sie fanden dabei eine kleine Menge α-Pyrrolidincarbonsäure; da sie aber die Estermethode benutzten, so ist ihr Resultat nicht einwandfrei.

Entsprechend dem früher mitgeteilten Arbeitsplan haben wir deshalb die Frage nochmals geprüft an dem Verhalten des Caseïns gegen Pepsinsalzsäure und Pankreatin. Die erstere erzeugt bei längerer Einwirkung bereits freie α-Pyrrolidincarbonsäure, die wir aus der Verdauungsflüssigkeit ohne Veresterung und ohne irgend welche Behandlung mit warmen Säuren isolieren konnten. Erheblich größer wird die Menge der zyklischen Aminosäure, wenn man auf die Behandlung mit Pepsinsalzsäure noch eine längere Verdauung durch Pankreatin folgen läßt. Ähnlich liegen die Verhältnisse für das Phenylalanin. Aber auch bei mehrmonatlicher kombinierter Wirkung von Pepsinsalzsäure und von Pankreatin fand sich in der Verdauungsflüssigkeit noch immer der polypeptidartige Stoff, von dem in der ersten Abhandlung ausführlich

---

[1]) Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente. Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 81 [1903]. (*S. 717.*)

[2]) Über die Wirkung des reinen Hundemagensaftes auf das Hämoglobin resp. Globin. Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**, 567 [1903].

die Rede gewesen ist; nur ist seine Menge entsprechend der weiter fortgeschrittenen Hydrolyse geringer als bei der bloßen Verdauung durch Pankreatin.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich erstens, daß die α-Pyrrolidincarbonsäure ebenso wie die gewöhnlichen Aminosäuren als Bestandteil des Proteïnmoleküls betrachtet werden darf, und zweitens, daß bei der kombinierten Wirkung von Pepsinsalzsäure und von Pankreatin eine stärkere Hydrolyse eintritt als beim Pankreatin allein.

Für die Beurteilung der natürlichen Verdauung ist damit ein neuer Gesichtspunkt gewonnen. Wir sind allerdings weit davon entfernt, die Resultate, welche in vitro erhalten wurden, unmittelbar auf die Vorgänge im lebenden Organismus übertragen zu wollen. Physiologische Fragen können in letzter Linie immer nur durch das physiologische Experiment entschieden werden, und das gilt selbstverständlich auch für die Fragen nach der hydrolytischen Spaltung der Proteïnstoffe im Verdauungstraktus. Aber die rein chemischen Beobachtungen dürfen beim Studium der Lebensvorgänge als Anhaltspunkte dienen, und so wird man in Zukunft wohl auch den Versuch machen, unter den Produkten der Magen-Darmverdauung die α-Pyrrolidincarbonsäure, das Phenylalanin, und endlich den polypeptidartigen Stoff, der so resistent gegen Enzyme ist, zu finden.

Experimenteller Teil.

Für die nachfolgenden Versuche diente das käufliche Caseïn. pur., welches nach den Angaben von Hammarsten dargestellt ist. Wir heben das besonders hervor, weil bei anderen unreineren Präparaten die Wirkung der Fermente sehr viel langsamer erfolgt, und das Resultat des Versuches sich wesentlich anders gestaltet.

1 kg Caseïn wurde in 7 L 0,3-prozentiger Salzsäure suspendiert, mit 50 g Pepsin (Grübler) versetzt und 14 Tage unter öfterem Umschütteln bei 37⁰ aufbewahrt. Durch Zusatz von Toluol war die Entwicklung von Fäulnisbakterien ausgeschlossen. Der größere Teil des Caseïns ging in Lösung, und gleichzeitig fiel eine nicht unbeträchtliche Menge von Tyrosin aus. Von der filtrierten Verdauungsflüssigkeit blieb die eine Hälfte noch 8 Wochen im Brutraum stehen. Die andere Hälfte wurde dagegen mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit 20 g Pankreatin (von der Fabrik Rhenania) versetzt. Um die Wirkung des Fermentes zu unterstützen, wurde die Flüssigkeit während drei Wochen mechanisch dauernd gerührt, und blieb dann noch weitere fünf Wochen ohne Rührung bei der gleichen Temperatur (37⁰) stehen. Auch hier erfolgte eine reichliche Abscheidung von Tyrosin und Leucin.

a) Pepsinverdauung:

Zum Nachweis der α-Pyrrolidincarbonsäure wurde die Hälfte der filtrierten Verdauungsflüssigkeit (entsprechend 250 g Caseïn) unter stark vermindertem Druck eingedampft, mit Alkohol gefällt, das alkoholische Filtrat abermals eingedampft, und die Fällung mit Alkohol noch 4—5 mal wiederholt. In der zuletzt verbleibenden alkoholischen Lösung war die Pyrrolidincarbonsäure neben Tryptophan und anderen Stoffen enthalten. Da die direkte Isolierung mit dem Kupfersalz mißlang, so wurde erst der Alkohol verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, und das Tryptophan in bekannter Weise mit einer Auflösung von Quecksilbersulfat in 5-prozentiger Schwefelsäure gefällt. Aus dem Filtrat mußte das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff, und dann die Schwefelsäure mit Baryt genau ausgefällt werden. Beim Einengen der Lösung trat jetzt der charakteristische Geruch des Pyrrolidins auf. Zur Isolierung der Carbonsäure wurde das Kupfersalz dargestellt und nach Verdampfen des Wassers mit Alkohol ausgelaugt. Der in Alkohol lösliche Teil der Kupfersalze gab beim Zerlegen mit Schwefelwasserstoff 0,15 g aktive α-Pyrrolidincarbonsäure vom Schmelzpunkt 205° (korr.).

Die andere Hälfte des Verdauungsgemisches wurde ganz genau, wie früher beschrieben (l. c.), mit Phosphorwolframsäure gefällt. Aus dem Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung konnten nach erfolgter Veresterung alle gewöhnlichen Monoaminosäuren isoliert werden. Phenylalanin und α-Pyrrolidincarbonsäure waren vorhanden, jedoch in sehr geringer Menge.

Der zerlegte Phosphorwolframsäureniederschlag hinterließ ein Polypeptid, das dem früher beschriebenen völlig glich und bei der totalen Hydrolyse und Veresterung dieselben Monoaminosäuren lieferte.

b) Pepsin-Pankreatin-Verdauung.

Die Hälfte der Verdauungsflüssigkeit (wieder 250 g Caseïn entsprechend) wurde ganz analog behandelt, wie das Pepsinverdauungsgemisch. Es konnten direkt 1,2 g reiner aktiver α-Pyrrolidincarbonsäure aus dem Kupfersalz isoliert werden.

0,1894 g des Kupfersalzes gaben 0,0951 g H_2O und 0,2844 g CO_2.

Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$:	5,49 % H und	41,16 % C.
Gefunden	5,6 % H „	40,95 % C.

Schmelzpunkt 206° (korr.).

Die andere Hälfte wurde, wie beschrieben, mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung gab bei der Veresterung 1,8 g α-Pyrrolidincarbonsäure und 1,3 g Phenylalanin.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag hinterließ nach der Zerlegung mit Baryt wieder einen polypeptidartigen Körper, in welchem bei der totalen Hydrolyse und Veresterung alle früher gefundenen Monoaminosäuren nachzuweisen waren.

c) Pankreatin-Verdauung.

Versuche, aus einem Pankreatin-Verdauungsgemisch auf die oben beschriebenen Weise die α-Pyrrolidincarbonsäure zu isolieren, hatten nur insofern Erfolg, als der Geruch des Pyrrolidins deutlich zur Wahrnehmung kam, während die Säure ebensowenig wie deren Kupfersalz isoliert werden konnte.

Eigenschaften des isolierten Polypeptides.

Das Polypeptid fällt mit Alkohol in weißen, groben Flocken, die nach Entfernung des Alkohols alsbald zerfließen. Bei wiederholter Fällung aus wässeriger Lösung mit Alkohol wird es zunächst teigig und schließlich hart. Rotes Lakmuspapier wird durch dasselbe stark gebläut. Die alkalische Reaktion nimmt aber mit dem Umfällen allmählich ab. Es muß unentschieden bleiben, ob dieselbe dem Polypeptid selbst zukommt oder aber, was wahrscheinlicher ist, beigemengten Diaminosäuren. Auf Curcumapapier und Phenolphtalein wirkt das Polypeptid nicht ein.

Versetzt man die alkalische Lösung des Polypeptids mit sehr wenig verdünnter Kupfersulfatlösung, so tritt zunächst eine schwache rötlichviolette Färbung ein, die aber bei weiterem Zusatz von Kupfersalz rasch in Blau umschlägt. Ähnlich verhalten sich mehrere künstliche Polypeptide, während die Peptone unter den gleichen Bedingungen eine sehr starke rotviolette Biuretfärbung zeigen.

Die wässerige Lösung des Polypeptids gibt mit Tannin eine Fällung. Mit Platinchlorid und Alkohol fällt eine leicht gelblich gefärbte, flockige Verbindung, welche bei weiterem Zusatz von Alkohol körnig wird. Die Verbindung löst sich sehr leicht in Wasser. Das auf gleiche Weise dargestellte Goldsalz wird aus der wässerigen Lösung mit Alkohol nicht gefällt.

Mit Eisenchlorid tritt auch nach Zusatz von Ammonsulfat keine Fällung ein. Ebensowenig wird das Polypeptid durch Chromsäure, Ferrocyankalium und Essigsäure gefällt. Quecksilberchlorid gibt einen dicken, weißen Niederschlag, der beim Kochen mit viel Wasser nicht ganz verschwindet.

56. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Notizen über Hydrolyse von Proteïnstoffen.

Zeitschrift für physiologische Chemie 42, 540 (1904).
(Eingegangen am 9. August.)

1. Hydrolyse des Caseïns.

Tyrosin, das aus Proteïnstoffen durch Kochen mit Schwefelsäure, genaues Ausfällen derselben mit Baryt und Kristallisation der eingeengten Lösung gewonnen wird, ist bekanntlich nicht rein und muß mehrmals aus Wasser umgelöst werden, bevor es die richtige Zusammensetzung zeigt. Bei einer neueren Untersuchung über die Spaltprodukte des Caseïns, die wir im Anschluß an die älteren Versuche des einen von uns[1]) und vor dem Erscheinen der ersten Anzeige von Skraup[2]) begonnen hatten, sind wir dieser Beobachtung nachgegangen und haben gefunden, daß das unreine Tyrosin mehrere Fremdkörper enthält, die sich durch Wasser abtrennen lassen, und die außerdem durch Phosphorwolframsäure aus ganz verdünnter Lösung gefällt werden. Zwei davon haben wir isoliert. Der eine ist Lysin, das trotz seiner großen Löslichkeit in Wasser dem rohen Tyrosin wahrscheinlich in Form einer schwer löslichen Kombination sich beimengt. Der andere ist eine in Wasser relativ schwer lösliche Aminosäure, von der Formel $C_{12}H_{26}N_2O_5$. Sie muß betrachtet werden als eine gesättigte aliphatische Oxyaminosäure, und wir bezeichnen sie vorläufig als Diaminotrioxydodecansäure, wobei es allerdings unbestimmt bleibt, ob die Kohlenstoffkette normal oder verzweigt ist. In dem Verhältnis von Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff gleicht sie der kürzlich von Skraup[3]) beschriebenen Caseïnsäure, dagegen ist der Wasserstoffgehalt erheblich größer; auch im optischen Verhalten sind so große Unterschiede, daß wir eine Verschiedenheit beider Säuren für wahrscheinlich halten.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 151 [1901]. (*S. 633.*)
[2]) Berichte d. d. chem. Gesellsch. 37, 1596 [1904].
[3]) l. c. und Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 292 [1904].

Da die Ausbeute an der Säure von der Art der Isolierung abhängig ist, so halten wir eine genaue Beschreibung der Versuchsbedingungen für notwendig: 2 kg Caseïn (nach Hammarsten) werden mit 12 L 25-prozentiger Schwefelsäure im Glaskolben 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht, auf etwa 30 L verdünnt, dann die Schwefelsäure mit reinem Ätzbaryt quantitativ ausgefällt, der Niederschlag abgenutscht, nochmals mit Wasser ausgekocht und wieder abfiltriert. Die vereinigten Filtrate werden in Porzellanschalen auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation des Tyrosins eingedampft. Der ersten Kristallisation vom Tyrosin, die abfiltriert wird, ist schon eine beträchtliche Menge der Diaminotrioxysäure beigemengt, aber eine noch größere Quantität findet sich in der Mutterlauge. Um sie zu gewinnen, dampft man weiter ein und sammelt die verschiedenen hierbei resultierenden Kristallisationen. Selbstverständlich enthalten diese auch Leucin, Glutaminsäure und andere Produkte. Sie werden von den leicht löslichen Teilen durch Waschen mit eiskaltem Wasser befreit. Die erste Kristallisation, die die Hauptmenge des Tyrosins enthält, wird in heißem Wasser gelöst, mit Tierkohle gekocht und aus dem Filtrat das Tyrosin durch Abkühlen ausgeschieden. Die Mutterlauge dient dann zur Gewinnung der Diaminotrioxydodecansäure. Die übrigen Fraktionen, die nur wenig Tyrosin mehr enthalten, werden direkt verarbeitet. Zur Isolierung der Diaminotrioxydodecansäure dient zuerst die Fällung mit Phosphorwolframsäure. Zu dem Zwecke wird die Mutterlauge vom Tyrosin auf etwa 8 L verdünnt, mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß sie 5% davon enthält, und dann eine Lösung von Phosphorwolframsäure zugefügt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Die drei weiteren Kristallisationen werden jede ebenfalls in 8 L Wasser gelöst und dann in derselben Weise behandelt. Die verschiedenen Niederschläge von Phosphorwolframaten wurden getrennt voneinander filtriert, scharf abgepreßt, mit Wasser nochmals sorgfältig gewaschen und dann mit überschüssigem Barytwasser in der üblichen Weise zerlegt. Als das Filtrat nach genauer Ausfällung des Baryts mit Schwefelsäure auf dem Wasserbade stark eingeengt war, fiel beim Erkalten die Diaminotrioxydodecansäure kristallinisch aus, während in der Mutterlauge leicht lösliche Produkte zurückblieben. Aus der Fraktion, die den Hauptteil des Tyrosins enthielt, haben wir an dieser Stelle das Lysin mit Hilfe des Pikrates nachgewiesen.

0,1827 g Substanz gaben 29,9 ccm N (22°, 761 mm).
0,1713 „ „ „ 0,2436 g CO_2 und 0,0750 g H_2O.

Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2 . C_6H_2(NO_2)_3OH$: 18,66% N, 38,40% C und 4,53% H.
Gefunden: 18,57% N, 38,78% C „ 4,86% H.

Die rohe Diaminotrioxydodecansäure wird zuerst einmal aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umgelöst. Zur völligen Reinigung dient dann die Kristallisation des Hydrochlorates. Zu dem Zwecke wird die Säure in heißer, starker Salzsäure gelöst, stark abgekühlt, das ausgeschiedene Hydrochlorat abgesaugt, mit starker Salzsäure gewaschen, dann in warmem Wasser gelöst und die Aminosäure durch Neutralisation mit Ammoniak ausgefällt. Die Ausbeute an reiner Säure beträgt ungefähr $^3/_4$% des Caseïns. Für die Analyse war das Präparat nochmals aus heißem Wasser umgelöst. Die im Vakuumexsikkator getrocknete Substanz verlor bei 120° nicht an Gewicht.

0,1589 g Substanz gaben 14,2 ccm N (25°, 763 mm).
0,1562 „ „ „ 0,1300 g H_2O und 0,2965 g CO_2.

Berechnet für $C_{12}H_{26}N_2O_5$: 10,07 % N, 51,79 % C, 9,35 % H.
Gefunden: 10,01 % N, 51,76 % C, 9,24 % H.

0,1551 g Substanz gaben 13,7 ccm N (27°, 760 mm).
0,1561 „ „ „ 0,2976 g CO_2 und 0,1297 g H_2O.

Gefunden: 9,81 % N, 51,99 % C, 9,23 % H.

0,1506 g Substanz gaben 0,2854 g CO_2 und 0,1286 g H_2O.

Gefunden: 51,68 % C, 9,49 % H.

Die Diaminotrioxydodecansäure hat keinen konstanten Schmelzpunkt, weil sie sich zersetzt. Im Kapillarrohr schmilzt sie gegen 255° unter Braunfärbung und Gasentwicklung. Die Kristallform ist nicht charakteristisch. Es sind meist leichte Blättchen, die in der Regel zu Rosetten oder kugeligen Aggregaten verwachsen sind. Die Verbindung reagiert auf Lackmuspapier ganz schwach sauer und schmeckt gar nicht süß, sondern sehr schwach bitter. In verdünnten Säuren ist sie leicht löslich, dagegen ist das Hydrochlorat, wie oben erwähnt, in starker Salzsäure recht schwer löslich. Es kristallisiert aus heißer Salzsäure in äußerst feinen Nädelchen und kann mit 20-prozentiger Salzsäure mehrere Stunden auf 125° erhitzt werden, ohne Zersetzung zu erleiden. Die wässerige Lösung der Aminosäure dreht das polarisierte Licht nach links. Bei einer 5-prozentigen wässerigen Lösung wurde die Drehung im 1-Dezimeterrohr —0,4 bis —0,46° gefunden. Die spezifische Drehung wäre demnach ungefähr —9°. Die Bestimmung darf aber nur als approximativ angesehen werden.

Das Kupfersalz, das durch Erwärmen der wässerigen Lösung mit überschüssigem Kupferoxyd oder Kupferkarbonat bereitet wurde, bildet eine tiefblaue Lösung und scheidet sich aus der Lösung in blaßblauen Blättchen aus. Es ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich. Im Vakuumexsikkator getrocknet, verändert es beim Erwärmen auf 120° weder sein Gewicht, noch seine blaue Farbe.

0,1246 g Substanz gaben 0,0287 g CuO.
0,1558 „ „ „ 0,0359 g CuO.

Berechnet für $C_{12}H_{24}N_2O_5Cu$: 18,72% Cu
Gefunden: 18,38% und 18,42% Cu.

Das Salz unterscheidet sich in der Zusammensetzung scharf von den Kupferverbindungen der gewöhnlichen Aminosäuren, es gleicht aber darin völlig dem Salz des Isoserins[1]).

2. Hydrolyse von Gelatine (Bildung von Serin).

Das in einer ganzen Reihe von Proteïnstoffen bereits nachgewiesene Serin entsteht auch bei der Spaltung der Gelatine durch Säuren. Für seine Gewinnung diente die Fraktion der Ester der Aminosäuren aus 1 kg Gelatine, die bei 0,6 mm Druck von 100—160° (Temperatur des Bades) destillierte. Sie wurde mit viel Petroläther versetzt, wobei der Serinester mit dem Ester der Asparaginsäure und anderen Produkten ölig ausfällt. Diese Fällung wurde mit 20 ccm Wasser versetzt, wiederholt mit Petroläther ausgeschüttelt, dann nach Abtrennung des Petroläthers mit überschüssigem Baryt auf dem Wasserbade 2 Stunden erhitzt, um die Ester zu verseifen. Nachdem der Baryt mit Schwefelsäure genau entfernt war, wurde die wässerige Lösung zur Trockene verdampft und der Rückstand mit Alkohol ausgekocht. Der unlösliche Teil enthielt das Serin, das beim Auslaugen mit wenig eiskaltem Wasser in Lösung ging und nach dem Entfärben der Flüssigkeit mit Tierkohle sich beim Eindunsten kristallinisch abschied. Die Analyse der Kristalle, die das Aussehen und das Verhalten des Serins zeigten, gab folgende Zahlen:

0,1702 g Substanz gaben 0,2147 g CO_2 und 0,1016 g H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NO_3$: 34,28% C und 6,66% H
Gefunden: 34,40% C „ 6,63% H.

Ihre Menge betrug 0,4% der Gelatine. Da die Isolierung aber mit großen Verlusten verbunden ist, so muß der wirkliche Gehalt an Serin erheblich größer sein.

---

[1]) E. Fischer und H. Leuchs, Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3795 [1902]. (*S. 256.*)

57. Emil Abderhalden: Hydrolyse des kristallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut.

Zeitschrift für physiologische Chemie 37, 484 (1903).
(Eingegangen am 5. März.)

In einer früheren Arbeit[1]) war gezeigt worden, daß sich bei der Hydrolyse des kristallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut mit Salzsäure nach der Veresterungsmethode[2]) die folgenden Spaltungsprodukte nachweisen lassen: Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, und α-Pyrrolidincarbonsäure. Anschließend an diese Untersuchung wurde nun versucht, einesteils die Mengenverhältnisse der genannten Verbindungen festzustellen und anderenteils weitere am Aufbau des Globinmoleküls beteiligte Komplexe zu isolieren. Neu aufgefunden wurden: Tyrosin, Cystin, Serin, Oxy-α-Pyrrolidincarbonsäure, Lysin, Arginin, Histidin und Tryptophan.

Das Serin wurde nach den Angaben von Emil Fischer und Peter Bergell[3]) als β-Naphtalinsulfoverbindung isoliert. Die Isolierung der Oxy-α-Pyrrolidincarbonsäure erfolgte nach den Angaben von Emil Fischer[4]) aus dem bei der Ausätherung der Ester verbleibenden Rückstande. Bei dem Nachweise des Lysins, des Arginins und des Histidins folgte ich den Angaben von Kossel und Kutscher[5]). Das Tryptophan endlich wurde mit der von Hopkins[6]) ausgearbeiteten Methode nachgewiesen.

---

[1]) Emil Fischer und Emil Abderhalden, Hydrolyse des Oxyhämoglobins durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 268 [1902]. (*S. 695.*)

[2]) Emil Fischer, Über Hydrolyse des Caseïns durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 151 [1901]. (*S. 633.*)

[3]) Emil Fischer und Peter Bergell, Über die β-Naphtalinsulfoderivate der Aminosäuren. Berichte d. d. chem. Gesellsch. 35, 3779 [1902]. (*S. 196.*)

[4]) Emil Fischer, Über eine neue Aminosäure aus Leim. Berichte d. d. chem. Gesellsch. 35, 2660 [1902]. (*S. 680.*)

[5]) A. Kossel und F. Kutscher, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 165 [1900/01].

[6]) Hopkins und Cole, A contribution to the chemistry of proteids. Journ. of Physiol. 27, 418 [1902].

Experimenteller Teil.

Für die Hydrolyse wurden 1000,0 g bei 100° getrocknetes Pferdeoxyhämoglobin verwandt. Dasselbe war nach der Methode von Zinoffsky-Abderhalden[1]) dargestellt und zweimal umkristallisiert worden.

Nach 6-stündigem Kochen des genannten Materials mit 3000 g rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 am Rückflußkühler wurde die Lösung in der bekannten Weise bei 10 mm Druck zum Sirup eingedampft, der Rückstand in absolutem Alkohol (3000 g) gelöst, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt, und um das bei der Veresterung sich bildende Wasser möglichst zu entfernen, der ganze Prozeß wiederholt. Nach nochmaligem Eindampfen wurden die Ester durch Zusatz von Äther, Kaliumcarbonat und sehr konzentrierter Natronlauge unter starker Kühlung isoliert.

Die fraktionierte Destillation erfolgte zunächst aus dem Wasserbade bei 10 mm Druck und nachher bei 0,2 mm Druck wiederum zuerst aus dem Wasserbad und zum Schluß aus dem Ölbad.

Hierbei wurden folgende Fraktionen erhalten:

1. Fraktion:	bis 40°	(Temp. der Dämpfe gemessen)	bei	10 mm Druck	45,0 g
2. ,,	40— 60°	(,, ,, ,, ,,)	,,	10 ,, ,,	69,5 ,,
3. ,,	100°	(,, des Wasserbades ,,)	,,	0,2 ,, ,,	240,2 ,,
4. ,,	100—130°	(,, ,, Ölbades ,,)	,,	0,2 ,, ,,	52,5 ,,
5. ,,	130—160°	(,, ,, ,, ,,)	,,	0,2 ,, ,,	56,1 ,,

Im Destillationskolben blieb eine dunkelrot gefärbte, beim Erkalten erstarrende Masse zurück. Dieselbe löste sich leicht in siedendem absoluten Alkohol. Nach Entfärbung der dunkelrot gefärbten Lösung mit Tierkohle und Einengen derselben schieden sich voluminöse Kristallmassen aus. Dieselben schmolzen bei 296° und erwiesen sich als Leucinimid. Isoliert wurden 5,5 g.

0,1145 g Substanz gaben 0,2672 g CO_2 und 0,0991 g H_2O.

Berechnet für $C_{12}H_{22}N_2O_2$:	Gefunden:
63,71 % C und 9,73 % H.	63,65 % C und 9,70 % H.

Die beim Ausäthern[2]) der Ester zurückbleibende dickbreiige Masse wurde in Wasser gelöst, mit Salzsäure schwach übersättigt und auf dem Wasserbad eingeengt. Von Zeit zu Zeit wurden die auskristallisierenden Salze abfiltriert. Der zuletzt übrig bleibende dicke, dunkelgefärbte Sirup wurde mit dem gleichen Volumen Alkohol, der

[1]) Emil Abderhalden, Resorption des Eisens usw. Zeitschr. f. Biologie **39**, 143 [1901]. Nach der angeführten Methode erhält man ca. 80% der theoretisch berechneten Ausbeute an reinem Oxyhämoglobin.

[2]) Emil Fischer, Über eine neue Aminosäure aus Leim. Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 2660 [1902]. (*S. 680.*)

etwas gasförmige Salzsäure enthielt, versetzt, die ausgeschiedenen Salze abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft und der Rückstand nochmals mit salzsäurehaltigem Alkohol behandelt. Die gesamten Salzmengen wurden wiederholt mit absolutem Alkohol extrahiert, bis sich keine organische Substanz mehr nachweisen ließ. Die Alkoholauszüge wurden vereinigt und im Vakuum eingedampft. Der zurückbleibende Sirup wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen und mit dem obengenannten Rückstande vereinigt. Diese Masse wurde nun in ganz analoger Weise, wie oben geschildert, verestert und die Ester in der üblichen Weise isoliert.

Bei dieser zweiten Veresterung wurden folgende Fraktionen erhalten:

1. Fraktion:	bis 40°	(Temp. der Dämpfe gemessen)	bei 10 mm	Druck	12,0 g
2. „	40— 60°	(„ „ „ „)	„ 10 „	„	25,5 „
3. „	100°	(„ des Wasserbades „)	„ 0,2 „	„	125,0 „
4. „	100—130°	(„ „ Ölbades „)	„ 0,2 „	„	20,1 „
5. „	130—160°	(„ „ „ „)	„ 0,2 „	„	25,9 „

Aus dem im Fraktionierkolben zurückbleibenden Rückstand wurde auch hier Leucinimid isoliert. Die Menge desselben betrug 2,5 g.

Da die Ausbeute an Estern noch sehr bedeutend war, wurde der ganze oben geschilderte Prozeß wiederholt.

Die dritte Veresterung ergab folgende Fraktionen:

1. Fraktion:	bis 40°	(Temp. der Dämpfe gemessen)	bei 10 mm	Druck	7,2 g
2. „	40— 60°	(„ „ „ „)	„ 10 „	„	12,0 „
3. „	100°	(„ des Wasserbades „)	„ 0,2 „	„	38,2 „
4. „	100—130°	(„ „ Ölbades „)	„ 0,2 „	„	9,1 „
5. „	130—160°	(„ „ „ „)	„ 0,2 „	„	11,0 „

Auch hier konnte aus der bei der Destillation zurückbleibenden Masse Leucinimid isoliert werden. Die Menge desselben betrug 1,2 g.

Die einander entsprechenden, verseiften Fraktionen wurden gemeinsam verarbeitet und ergaben folgende Resultate:

Fraktion 1 (bis 40°).

Dieselbe enthielt neben Alkohol und Äther hauptsächlich Alanin. Glykocoll konnte keines isoliert werden[1]). Die Menge des Alanins

[1]) Spiro, Karl, Über Nachweis und Vorkommen des Glykocolls, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 174—191 [1890] und Dubrowin, Fr., Über den Gehalt an Glykocoll in verschiedenen Eiweißkörpern, Diss., St. Petersburg, 1902, geben an, im Hämoglobin Glykocoll nachgewiesen zu haben. Da das Serumglobulin des Pferdes einen sehr hohen Glykocollgehalt besitzt (ca. 3¹/₄—4%), liegt die Vermutung nahe, daß die beiden Autoren nicht ganz reine Präparate untersucht haben. Ein nur einmal umkristallisiertes Präparat ergab 0,62% Glykocoll, während nach dem zweiten Umkristallisieren kein Glykocoll mehr nachweisbar war.

aus allen drei Fraktionen betrug 14,2 g. Der Schmelzpunkt war 293° (unkorr.).

0,2012 g Substanz gaben 0,2988 g CO_2 und 0,1450 g H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:	Gefunden:
40,45 % C und 7,87 % H.	40,50 % C und 8,08 % H.

Fraktion 2 (40—60°).

Isoliert wurden durch wiederholte fraktionierte Kristallisation 26,0 g Alanin, 30,7 g Leucin und 1,0 g α-Pyrrolidincarbonsäure.

Fraktion 3 (100°).

Sie bestand aus 247,5 g Leucin und 21,5 g α-Pyrrolidincarbonsäure.

Der Schmelzpunkt des Leucins lag bei 298° (unkorr.).

0,2114 g Substanz gaben 0,4263 g CO_2 und 0,1905 g H_2O.

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$:	Gefunden:
54,96 % C und 9,92 % H.	54,99 % C und 10,10 % H.

Die α-Pyrrolidincarbonsäure schmolz bei 208° (unkorr.).

0,1185 g Substanz gaben 0,2264 g CO_2 und 0,0844 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_9NO_2$:	Gefunden:
52,18 % C und 7,83 % H.	52,10 % C und 7,98 % H.

Fraktion 4 (100—130°).

Hier wurde jede einzelne Fraktion für sich sofort nach der Destillation auf Phenylalanin[1]) verarbeitet. Es wurden erhalten 19,5 g Phenylalanin. Der Zersetzungspunkt lag bei 280° (unkorr.).

0,2198 g Substanz gaben 0,5276 g CO_2 und 0,1330 g H_2O.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_2$:	Gefunden:
65,45 % C und 6,66 % H.	65,46 % C und 6,77 % H.

Das vom Phenylalaninester getrennte Estergemisch wurde mit Baryt verseift. Die aus den drei Destillationen erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt, der Baryt, nachdem das auskristallisierte asparaginsaure Baryum abfiltriert worden war, mit Schwefelsäure quantitativ gefällt. Das Filtrat vom $BaSO_4$-Niederschlag wurde im Vakuum eingeengt und hierauf in zwei gleiche Portionen geteilt. Die eine diente zur Isolierung von Glutamin- und Asparaginsäure, die andere wurde zur Prüfung auf Serin verwandt. Aus der ersteren wurden 4,2 g Glutamin-

---

[1]) Emil Fischer und Emil Abderhalden, l. c., S. 273. (*S. 699.*)

säure und 9,2 g Asparaginsäure isoliert. Aus dem asparaginsauren Baryt wurden durch Zersetzen mit Schwefelsäure 2,1 g Asparaginsäure erhalten.

Die Elementaranalyse ergab:

0,1089 g Substanz gaben 0,1627 g CO_2 und 0,0588 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_9NO_4$:	Gefunden:
40,81% C und 6,12% H.	40,74% C und 6,05% H.

0,1002 g Substanz gaben 0,1323 g CO_2 und 0,0477 g H_2O.

Berechnet für $C_4H_7NO_4$:	Gefunden:
36,09% C und 5,26% H.	36,01% C und 5,33% H.

Aus der anderen Hälfte dieser Fraktion wurde das Serin nach der von Emil Fischer und Peter Bergell[1]) beschriebenen Methode als β-Naphtalinsulfoverbindung isoliert. Es wurden erhalten 4,8 g β-Naphtalinsulfoserin, daraus berechnet 1,7 g Serin.

0,1112 g Substanz gaben 0,2161 g CO_2 und 0,0448 g H_2O.

Berechnet für $C_{13}H_{13}O_5NS$:	Gefunden:
52,88% C, 4,41% H.	53,00% C, 4,51% H.

Die aus heißem Alkohol umkristallisierte Verbindung schmolz bei 213° (unkorr.).

Fraktion 5 (130—160°).

Diese Fraktion wurde genau in derselben Weise wie Fraktion 4 verarbeitet. Es wurden gefunden: 21,1 g Phenylalanin, 4,1 g Glutaminsäure, 11,0 g Asparaginsäure und 1,0 g Serin.

Der nach der dritten Ausätherung verbleibende Rückstand wurde in Wasser gelöst, mit Salzsäure schwach übersättigt und hierauf in der oben geschilderten Weise von allen anorganischen Bestandteilen befreit. Die zuletzt verbleibende Mutterlauge wurde zur Entfernung der überschüssigen Salzsäure mehrmals im Vakuum eingedampft. Hierauf wurde $^1/_{10}$ der gesamten wässerigen Lösung des Rückstandes zur gänzlichen Entfernung der Salzsäure mit Silbersulfat geschüttelt und das Filtrat zur Entfernung des überschüssigen Silbers mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach Verjagen des Schwefelwasserstoffes wurde die Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde abgesaugt und nach der Kosselschen[2]) Methode auf Diaminosäuren verarbeitet. Es wurden identi-

[1]) Emil Fischer und Peter Bergell, Über die β-Naphtalinsulfoderivate der Aminosäuren. Berichte d. d. chem. Gesellsch. **35**, 3779 [1902]. (*S. 196.*)

[2]) A. Kossel und F. Kutscher, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 165 [1900/01].

fiziert das Lysin als Pikrat, das Histidin als Dichlorid und das Arginin als Nitrat.

Es wurden erhalten 4,1 g Lysin, 5,2 g Arginin und 10,5 g Histidin. Berechnet auf die ganze Menge 41,0 g Lysin, 52,0 g Arginin und 105,0 g Histidin.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde zur Entfernung der Phosphorwolframsäure mit überschüssigem Baryumhydroxyd und mit Kohlensäure behandelt und aus dem Filtrat der Baryt quantitativ mit Schwefelsäure gefällt. Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingeengt. Es verblieb ein hellbraun gefärbter Sirup, welcher nach mehrtägigem Stehen im Vakuumexsikkator nach Einimpfung eines Kriställchens von Oxy-α-Pyrrolidincarbonsäure erstarrte.

Es wurden erhalten 1,0 g Oxy-α-Pyrrolidincarbonsäure.

0,1233 g Substanz gaben 0,2076 g CO_2 und 0,0761 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_9O_3N$:	Gefunden:
45,80 % C und 6,86 % H.	45,91 % C und 6,91 % H.

Schmelzpunkt: 268° (unkorr.).

Von dieser Substanz wurde auch die β-Naphtalinsulfoverbindung dargestellt.

0,2542 g Substanz gaben 0,4941 g CO_2 und 0,1130 g H_2O.

Berechnet für $C_{15}H_{15}O_5NS + H_2O$:	Gefunden:
53,09 % C und 5,01 % H.	53,01 % C und 4,97 % H.

Schmelzpunkt: 91° (unkorr.).

Bestimmung des Tyrosins.

250 g Hämoglobin wurden mit einem Gemisch von 500 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 2500 g Wasser 18 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wurde dann noch warm mit ca. 2 kg Barythydrat versetzt, der überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt, und die neutrale Flüssigkeit heiß auf einer Nutsche abgesogen. Der Barytniederschlag wurde wiederholt mit Wasser ausgekocht. Die vereinigten Filtrate wurden bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt. Die nach dem Erkalten abfiltrierte Kristallmasse wurde mit wenig heißem Wasser ausgekocht. Es verblieben nach erfolgter Entfärbung mit Tierkohle 3,2 g Tyrosin.

0,2115 g Substanz gaben 0,4622 g CO_2 und 0,1132 g H_2O.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_3$:	Gefunden:
59,66 % C und 6,07 % H.	59,60 % C und 5,99 % H.

Zersetzungspunkt: 316° (unkorr.).

Bestimmung des Cystins.[1])

300 g Hämoglobin wurden mit 900 ccm rauchender Salzsäure (vom spezifischen Gewicht 1,19) 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Erkalten wurde die wiederholt mit Tierkohle ausgekochte Flüssigkeit mit konzentrierter Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Nach 12-stündigem Stehen hatte sich ein Niederschlag abgesetzt, welcher abgesaugt wurde. Er bestand im wesentlichen aus Tyrosin und Cystin. Zur Trennung der beiden wurde der Niederschlag in heißem, 10-prozentigem Ammoniak gelöst, die Lösung abgekühlt und das ausgeschiedene Tyrosin abfiltriert. Zur Abscheidung des Cystins wurde das Filtrat mit Eisessig allmählich versetzt.

Das ausgeschiedene Cystin gab keine Millon'sche Reaktion mehr. Seine Menge betrug 0,9 g.

0,2841 g Substanz gaben 0,5547 g $BaSO_4$ = 0,0762 g S.

Berechnet für $C_6H_{12}N_2S_2O_4$:	Gefunden:
26,66 % S.	26,82 % S.

Nachweis des Tryptophans.

100 g Oxyhämoglobin wurden in einem Liter Wasser suspendiert, mit 2 ccm Ammoniak und 4 g Pankreatin[2]) versetzt. Zur Verhinderung der Fäulnis wurden Toluol und Chloroform zugesetzt. Nach dreimal 24-stündigem Stehen bei 37° fiel die Reaktion mit Bromwasser bereits positiv aus. Nach weiterem 14-tägigen Stehen des Gemisches bei 37° wurden das abgeschiedene Hämatin und das unverdaute Hämoglobin abfiltriert. Zum Filtrat wurde Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 5% zugesetzt und hierauf mit einer Lösung von 10% Quecksilbersulfat und 5% Schwefelsäure gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert. Derselbe enthält Cystin, Tyrosin usw. und, wie die „Tryptophanreaktion" mit Bromwasser und die Pyrrolreaktion zeigte, auch Tryptophan[3]).

Berechnet man die Mengen der erhaltenen Spaltungsprodukte auf 100,0 g Oxyhämoglobin, dann erhält man folgende Resultate:

---

[1]) Vgl. E. Friedmann, Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Beziehungen der schwefelhaltigen Eiweißabkömmlinge. Beiträge z. chem. Physiologie u. Pathologie **3** [1902] und K. A. H. Mörner, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteïnstoffen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**, 207 [1902].

[2]) Das Präparat stammte von der chemischen Fabrik „Rhenania", Aachen.

[3]) Weitere Untersuchungen wurden nicht ausgeführt, weil Hopkins das Gebiet bearbeitet. Vgl. Hopkins und Cole, A contribution to the chemistry of proteids, Journ. of Physiol. **27**, 418 [1902].

Alanin	4,02
Leucin	27,82
α-Pyrrolidincarbonsäure	2,25
Phenylalanin	4,06
Glutaminsäure	1,66
Asparaginsäure	4,25
Cystin	0,3
Serin	0,54
Oxy-α-Pyrrolidincarbonsäure	1,0
Tyrosin	1,28
Lysin	4,1
Histidin	10,5
Arginin	5,2
Tryptophan	vorhanden
In Summa	66,98%.

Dazu kommen noch 0,92% Leucinimid[1]).

Auf 100 g Globin[2]) berechnet, erhält man folgende Mengenverhältnisse:

Alanin	4,19
Leucin	29,04
α-Pyrrolidincarbonsäure	2,34
Phenylalanin	4,24
Glutaminsäure	1,73
Asparaginsäure	4,43
Cystin	0,31
Serin	0,56
Oxy-α-Pyrrolidincarbonsäure	1,04
Tyrosin	1,33
Lysin	4,28
Histidin	10,96
Arginin	5,42
Tryptophan	vorhanden.
In Summa	69,87%

Die erhaltenen Spaltungsprodukte betreffend, ist folgendes zu bemerken: Das Leucinimid ist höchst wahrscheinlich ein aus Leucin sekundär entstandenes Produkt. Salaskin[3]) hat zwar bei der trypti-

[1]) Vgl. die Bemerkung am Schlusse der Arbeit über das Leucinimid.

[2]) Die Menge des Hämatins ist nach F. N. Schulz (Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 469 [1898] als 4,2% des Oxyhämoglobins angenommen.

[3]) S. Salaskin, Über die Bildung des Leucinimids bei der peptischen und tryptischen Verdauung des Oxyhämoglobins resp. des Globins. Zeitschr. f. physiol.

schen und bei der peptischen Verdauung Leucinimid isoliert. Die Art der Isolierung desselben schließt eine Bildung desselben aus Leucin nicht mit absoluter Sicherheit aus. Sehr fraglich ist auch, ob das Cystin im Eiweißmolekül präformiert ist. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß dasselbe sich sekundär bildet.

Gefunden wurden nach den vorstehenden Tabellen 66,98% an Spaltungsprodukten des Hämoglobins oder 69,87% des Globins. Von dieser Summe muß das bei der Spaltung aufgenommene Wasser abgezogen werden. Es fällt dadurch der Prozentsatz der noch fehlenden Spaltungsprodukte noch sehr groß aus. Andererseits ist zu bedenken, daß bei der Isolierung der einzelnen Spaltungsprodukte Verluste unvermeidlich sind, auch gelingt es selbst nach dreimaliger Veresterung nicht, die Monoaminosäure quantitativ zu gewinnen. Der Rückstand zeigte auch nach dem letzten Ausäthern der Ester immer noch einen sehr starken Estergeruch. Wie eine genaue Untersuchung der einzelnen Fraktionen zeigte, ist die Hauptaufmerksamkeit den höheren Fraktionen zuzuwenden.

Anmerkung.

Zinoffsky[1]) gibt als elementare Zusammensetzung des von ihm nach seiner Methode dargestellten Präparates: C 51,15, H 6,76, N 17,94, S 0,3899, Fe 0,335, O 23,421 an. Es weichen diese Zahlen von den von anderen Autoren an nach anderen Methoden erhaltenen Präparaten gewonnenen Werten in bezug auf Kohlenstoff und Wasserstoff wesentlich ab. F. N. Schulz[2]) spricht deshalb die Vermutung aus, daß die nach der Methode von Zinoffsky erhaltenen Kristalle eine andere Zusammensetzung hatten, als die von anderen Autoren dargestellten Oxyhämoglobinkristalle. Wie meine an 10 verschiedenen Präparaten ausgeführten Elementaranalysen ergaben, ist dies nicht der Fall. Es wurden im Mittel erhalten: C 54,75, H 6,98, N 17,35, S 0,42, Fe 0,38, O 20,12. Zur Lösung der Stromata wurde allerdings nicht Ammoniak, sondern Äther verwendet. Allein auch ein unter Anwendung von Ammoniak dargestelltes Präparat zeigte dieselben Analysenzahlen.

Chem. **32**, 592 [1901]. Vgl. auch H. Ritthausen, Über Leucinimid, ein Spaltungsprodukt der Eiweißkörper beim Kochen mit Säuren. Berichte d. d. chem. Gesellsch. 2109 [1896].

[1]) Zinoffsky, Über die Größe des Hämoglobinmoleküls. Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 16 [1886].

[2]) F. N. Schulz, Die Kristallisation von Eiweißstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweißchemie. Jena, Gustav Fischer, 1901, S. 37.

58. Emil Abderhalden: Hydrolyse des kristallisierten Serumalbumins aus Pferdeblut.

Zeitschrift für physiologische Chemie 37, 495 (1903).
(Eingegangen am 5. März.)

Auf 100,0 g bei 100° getrocknetes Serumalbumin berechnet ergeben sich folgende Mengenverhältnisse:

Alanin	2,68
Leucin	20,00
α-Pyrrolidincarbonsäure	1,04
Phenylalanin	3,08
Glutaminsäure	1,52
Asparaginsäure	3,12
Cystin	2,3
Serin	0,6
Tyrosin	2,1
Tryptophan	vorhanden
Summa	36,44

---

59. Emil Abderhalden: Hydrolyse des Edestins.

Zeitschrift für physiologische Chemie 37, 499 (1902).
(Eingegangen am 5. März.)

Auf 100 g Edestin berechnen sich die Spaltprodukte, wie folgt:

Glykocoll	3,8
Alanin	3,6
Leucin	20,9
α-Pyrrolidincarbonsäure	1,7
Phenylalanin	2,4
Glutaminsäure	6,3
Asparaginsäure	4,5
Cystin	0,25
Serin	0,33

Oxy-α-Pyrrolidincarbonsäure	2,0
Tyrosin	2,13
Lysin	1,0
Histidin	1,1
Arginin	11,7
Tryptophan	vorhanden
Summa	61,71%

60. Emil Abderhalden: Nachtrag zur Hydrolyse des Edestins.

Zeitschrift für physiologische Chemie **40**, 249 (1903).
(Eingegangen am 7. November.)

Nachweis des Gehaltes an Aminovaleriansäure.

61. Emil Abderhalden: Die Monoaminosäuren des Salmins.

Zeitschrift für physiologische Chemie **41**, 55 (1904).
(Eingegangen am 7. Januar.)

Als Spaltungsprodukte des Salmins wurden mit Sicherheit nachgewiesen: Alanin, Leucin und α-Pyrrolidincarbonsäure. Als wahrscheinlich vorhanden zu bezeichnen sind Phenylalanin und Asparaginsäure.

62. Emil Abderhalden und P. Rona: Die Abbauprodukte des „Thymushistons".

Zeitschrift für physiologische Chemie **41**, 278 (1904).
(Eingegangen am 2. März.)

Die Gesamtmenge der isolierten Monoaminosäuren betrug für 150 g trockenes Histon

		In Gramm	In Proz.
	Glykocoll	0,75	0,50
	Alanin	5,2	3,46
	Leucin	17,7	11,80
	α-Pyrrolidincarbonsäure	2,2	1,46
	Phenylalanin	3,3	2,20
	Glutaminsäure	0,8	0,53
Ferner gaben 50 g Histon:	Tyrosin	2,6	5,20
			25,15%

63. Emil Abderhalden und A. Schittenhelm: Die Abbauprodukte des Elastins.

Zeitschrift für physiologische Chemie 41, 293 (1904).
(Eingegangen am 8. März.)

Die Gesamtmenge der isolierten Monoaminosäuren betrug für 400 g Elastin:

	In Gramm	In Prozent
Glykocoll	103,0	25,75
Leucin	85,5	21,38
Alanin	26,3	6,58
Phenylalanin	15,55	3,89
α-Pyrrolidincarbonsäure	6,97	1,74
Glutaminsäure	3,04	0,76
Aminovaleriansäure	4,0	1,0
	in Summa	61,10

---

64. Emil Abderhalden: Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus.

Zeitschrift für physiologische Chemie 44, 17 (1905).
(Eingegangen am 30. Januar.)

100 g Serumglobulin enthalten:

Glykocoll	3,52
Alanin	2,22
Leucin	18,70
Pyrrolidincarbonsäure	2,76
Phenylalanin	3,84
Glutaminsäure	2,20
Asparaginsäure	2,54
Cystin	0,67

Ovomucoid.

50 g aus Hühnereiern isoliertes Ovomucoid ergaben 2 g Leucin, 1,2 g α-Pyrrolidincarbonsäure, 2 g Phenylalanin, 0,9 g Asparaginsäure, 1 g Glutaminsäure.

---

65. Emil Abderhalden und Otto Rostoski: Die Monoaminosäuren des „Edestins" aus Baumwollsamen und dessen Verhalten gegen Magensaft.

Zeitschrift für physiologische Chemie 44, 265 (1905).
(Eingegangen am 20. März.)

Im Edestin aus Baumwollsamen wurden auf 100 g trockenes, aschefreies Eiweiß berechnet folgende Produkte isoliert:

Glykocoll	1,2%
Alanin	4,5%
Aminovaleriansäure	vorhanden
α-Prolin	2,3%
Leucin	15,5%
Glutaminsäure	17,2%
Asparaginsäure	2,9%
Phenylalanin	3,9%
Serin	0,4%
Tyrosin	2,3%
Tryptophan	vorhanden.

Zur möglichst vollständigen Gewinnung der Glutaminsäure wurde hier der bei der Destillation der Ester verbleibende Rückstand nach folgender Methode verarbeitet:

Er wurde mit viel Essigäther ausgekocht. Ein geringer Teil ging in Lösung. Nach dem Verdampfen des Essigäthers hinterblieb eine geringe Menge einer voluminösen Kristallmasse. Sie zeigte alle Eigenschaften des Leucinimids. Der nicht in Essigäther lösliche Rückstand wurde 6 Stunden mit überschüssigem Barythydrat gekocht, und nach dem Abkühlen der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ entfernt. Durch Einengen der so erhaltenen Lösung ließen sich zunächst Kristallisationen von ganz reiner Glutaminsäure gewinnen (8,3 g). Weitere Mengen wurden durch völliges Eindampfen der zuletzt verbleibenden sirupösen Mutterlauge, Lösung des Rückstandes in konzentrierter Salzsäure, Einleiten von Salzsäuregas gewonnen (8 g). Aus der Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrates wurde die Salzsäure mit Bleioxyd entfernt. Es gelang nicht, aus dieser Mutterlauge zu kristallisierten, einheitlichen Produkten zu gelangen. Auch der Versuch, Kupfersalze darzustellen, führte zu keinen einwandsfreien Resultaten.

---

66. Emil Abderhalden und Franz Samuely: Die Zusammensetzung des „Gliadins“ des Weizenmehles.

Zeitschrift für physiologische Chemie 44, 276 (1905).
(Eingegangen am 21. März.)

Auf 100 g asche- und wasserfreies Gliadin (nach Abzug der Huminsubstanzen) berechnet sich folgende Zusammensetzung:

Glykocoll	0,68%
Alanin	2,66%
Aminovaleriansäure	0,33%
α-Prolin	2,4%
Leucin	6,0%
Glutaminsäure	27,6%
Asparaginsäure	1,24%
Phenylalanin	2,6%
Serin	0,12%
Tyrosin	2,37%
Tryptophan	ca. 1%

---

67. Emil Abderhalden und Béla Reinbold: Die Monoaminsäuren des „Edestins“ aus Sonnenblumensamen und dessen Verhalten gegen Pankreassaft.

Zeitschrift für physiologische Chemie 44, 284 (1905).
(Eingegangen am 21. März.)

Auf 100 g asche- und wasserfreies Eiweiß berechnet ergeben sich folgende Mengenverhältnisse an Aminosäuren:

Glykocoll	2,5%
Alanin	4,5%
Aminovaleriansäure	0,6%
α-Prolin	2,8%
Leucin	12,9%
Glutaminsäure	13,0%
Asparaginsäure	3,2%
Phenylalanin	4,0%
Tyrosin	2,0%
Serin	0,2%

---

68. Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi: Die Zusammensetzung von aus Kiefernsamen dargestelltem Eiweiß.

Zeitschrift für physiologische Chemie 45, 473 (1905).
(Eingegangen am 21. Juli.)

Auf 100 g reines Eiweiß berechnen sich:

Glykocoll	0,6%
Alanin	1,8%
Aminovaleriansäure	vorhanden
α-Prolin	2,8%
Leucin	6,2%
Glutaminsäure	7,8%
Asparaginsäure	1,8%
Phenylalanin	1,2%
Serin	0,08%
Tyrosin	1,7%
Tryptophan	vorhanden.

69. Emil Abderhalden und J. B. Herrick: Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Conglutins aus Samen von Lupinus.

Zeitschrift für physiologische Chemie 45, 479 (1905).
(Eingegangen am 23. Juli.)

Berechnet man die gefundenen Mengen an Aminosäuren auf 100 g reines Conglutin, so erhält man folgende Werte:

Glykocoll	0,8%
Alanin	2,5%
Aminovaleriansäure	1,1%
Leucin	6,75%
Prolin	2,6%
Phenylalanin	3,1%
Glutaminsäure	6,5%
Asparaginsäure	3,0%

70. Emil Abderhalden und Fritz Pregl: Über einen im normalen menschlichen Harn vorkommenden, schwer dialysierbaren Eiweißabkömmling.

Zeitschrift für physiologische Chemie **46**, 19 (1905).
(Eingegangen am 2. August.)

Es gelang, Leucin, Alanin, Glykocoll und Glutaminsäure zu isolieren und die Anwesenheit von Phenylalanin durch die Reaktion mit Schwefelsäure und Kaliumdichromat festzustellen. Auch Asparaginsäure dürfte vorhanden sein.

---

71. Emil Abderhalden und Fritz Pregl: Die Monoaminosäuren des kristallisierten Eieralbumins.

Zeitschrift für physiologische Chemie **46**, 24 (1905).
(Eingegangen am 2. August.)

Auf 100 g aschefreies, bei 100° getrocknetes kristallisiertes Eieralbumin berechnen sich aus den vorliegenden Befunden:

Alanin	2,1 g
Leucin	6,1 ,,
Prolin	2,25 ,,
Asparaginsäure	1,5 ,,
Glutaminsäure	8,0 ,,
Phenylalanin	4,4 ,,
Tyrosin	1,1 ,,
Cystin	0,2 ,,

---

72. Emil Abderhalden und H. Gideon Wells: Die Monoaminosäuren des Keratins aus Pferdehaaren.

Zeitschrift für physiologische Chemie **46**, 31 (1905).
(Eingegangen am 5. August.)

Glykocoll	4,7 g
Alanin	1,5 ,,
Aminovaleriansäure	0,9 ,,
Leucin	7,1 ,,
Prolin	3,4 ,,
Asparaginsäure	0,3 ,,
Glutaminsäure	3,7 ,,
Tyrosin	3,2 ,,
Serin	0,6 ,,

---

73. Emil Abderhalden und E. R. Le Count: Die Monoaminosäuren des Keratins aus Gänsefedern.

Zeitschrift für physiologische Chemie 46, 40 (1905).
(Eingegangen am 5. August.)

Berechnet man die gefundenen Mengen an einzelnen Aminosäuren auf 100 g asche- und wasserfreies Keratin, so erhält man folgende Werte:

Glykocoll	2,6 g
Alanin	1,8 ,,
Aminovaleriansäure	0,5 ,,
Leucin	8,0 ,,
Prolin	3,5 ,,
Glutaminsäure	2,3 ,,
Asparaginsäure	1,1 ,,
Tyrosin	3,6 ,,
Serin	0,4 ,,

---

74. Emil Abderhalden und Otto Rostoski: Beitrag zur Kenntnis des Bence-Jonesschen Eiweißkörpers.

Zeitschrift für physiologische Chemie 46, 125 (1905).
(Eingegangen am 16. August.)

Die Gewinnung der freien Ester erfolgte hier in einer von der bisher üblichen Methode abweichenden Art, und zwar in Anlehnung an die von Emil Fischer und Umetaro Suzuki[1]) angewandte Methode der Darstellung der freien Diaminosäureester. Die salzsaure, alkoholische Lösung der Hydrochlorate der Ester wurde bei vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur möglichst stark eingedampft, um die freie Salzsäure möglichst vollständig zu entfernen. Der Rückstand, der die Hydrochlorate der Ester enthielt, wurde nun in wenig Äthylalkohol völlig aufgelöst, die Lösung in einen Meßkolben von 250 ccm gebracht und bis zur Marke genau mit Äthylalkohol aufgefüllt. Nun wurde in einem aliquoten Teil (5 ccm) der Salzsäuregehalt bestimmt und dann durch Zusatz der berechneten Menge einer alkoholischen Lösung von Natrium die Ester in Freiheit gesetzt. Vor dem Zusatz des Natriumäthylats war die Lösung mit Äther überschichtet und in Eis gestellt worden. Durch weiteren Zusatz von Äther wurde die Hauptmenge des gebildeten Kochsalzes gefällt,

[1]) Emil Fischer und Umetaro Suzuki: Polypeptide der Diaminosäuren. Sitzungsberichte der Akademie zu Berlin, 52 [1904]. (*S. 441.*)

vom Ausgeschiedenen abfiltriert und nun die ätherisch-alkoholische Lösung durch Schütteln mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Der Äther wurde dann abdestilliert und der verbleibende Rückstand, wie üblich, der fraktionierten Destillation unterworfen.

Auf 100 g trockenes, aschefreies Eiweiß berechnen sich:

Glykocoll	1,7 g
Alanin	4,5 ,,
Leucin	10,6 ,,
Prolin	1,9 ,,
Phenylalanin	1,5 ,,
Glutaminsäure	6,0 ,,
Asparaginsäure	4,5 ,,
Tyrosin	1,7 ,,

Sachregister.





Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig-R.











